

C/1080

B-h



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID.**

**FACULTAD DE CIENCIAS.**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR.**

***“ FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA U-box PHO1 EN LA  
INTEGRACIÓN DE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DE  
GIBERELINAS (GAs) Y DE DEFENSA FRENTE A PATÓGENOS”.***

**TESIS DOCTORAL.**

**JUAN MANUEL IGLESIAS PEDRAZ.**

UNIVERSIDAD AUTONOMA MADRID  
REGISTRO GENERAL

Entrada 001 N°. 200800002506  
12/02/2008 16:33:15

**MADRID, 2008.**

54c8711833



**Memoria presentada por D. Juan Manuel Iglesias Pedraz para optar  
el grado de Doctor en Ciencias, sección Biológicas, por la  
Universidad Autónoma de Madrid.**

**Dra. Salomé Prat Monguió  
Directora de Tesis.**

**Dra. Ana Espinosa Ruiz  
Co-Directora de Tesis.**

**Dra. Marta Izquierdo Rojo  
Tutora de Tesis.**



**“Permaneces como el hombre que se priva de forma voluntaria de unos sentidos, porque no está matemáticamente seguro de sus resultados. Pero ¿podemos estar seguros de algo? La vida es una cadena de inseguridades, pero hay que vivirla, vivirla corriendo un inmenso riesgo de equivocarnos. Un riesgo que algunos, ciertamente, no desean y dimiten. Pero la mayoría optamos por seguir, quizás esperando un milagro, una luz que nos aclare el camino y dé respuestas a nuestras preguntas. Esperamos. ¿Y que es la esperanza sino un sentimiento, el más poderoso de todos?”**

**Fragmento de la carta de Pétrea a Alcibiades.**

**En: “Alcibiades, el primer griego”**

**Josep M<sup>a</sup> Albaigès.**

**A la memoria de mi padre  
y al apoyo de mi madre.**

**“Es justamente la posibilidad de realizar un sueño lo que hace que la vida sea interesante”.**

**“El Alquimista”.  
Paolo Coelho.**

## **AGRADECIMIENTOS.**

A la Dra. Salomé Prat por la sabia dirección de este trabajo y el apoyo que me brindó durante esta etapa de mi vida. Por sus buenos y malos ratos, por soportarme en esos momentos difíciles y enseñarme a ver las cosas desde otra perspectiva. Gracias Salo, he aprendido mucho estos años.

A la Dra. Ana Espinosa por su paciencia y sus explicaciones, por saber llevarme y enseñarme esas cosas que suelen ser muy sutiles de ver. Por compartir esos ratos de agobio, por las alegrías y las penas que hemos pasado juntos.

A Carlos Cuellar por su empeño en el trabajo, aun recuerdo tu primer día, por esos buenos momentos que hemos pasado juntos y por las innumerables veces que me dejaste colgado con los medios. Por esas noches en Madrid, por esos ratos de tertulia en el CNB y por ser un gran compañero y amigo.

A mis compañeros de laboratorio, Miguel, Jean Michel, Cristina y Abe y a aquellos que se fueron, por compartir nuestras penas y alegrías, por ser tan buen colegas, por las risas y por supuesto por las conversaciones serias y las discusiones de trabajo.

A la Dra. Carmen Castresana y Miguel Ángel López por la ayuda brindada en la parte final de la tesis.

Al Dr. Juan Antonio García por las innumerables respuestas a mis preguntas, a Elvira por su apoyo y en general al 313 por su amistad.

Al Dr. Enrique Rojo y al Dr. Vicente Rubio, a ambos por su mano amiga, su paciencia para enseñarme y por sus anticuerpos.

A la Dra. Cristina Martinez por su amistad durante mi estancia en Yale y por permitirme enseñarle algunas cosas y por ese Nature que nos resulto.

A la gente de la tercera por aguantar mis correrías por los pasillos y por los buenos ratos de conversaciones pasillísticas, a la gente que aún está y a aquella que ya no, gracias por la amistad, eso no tiene precio.

A la gente del invernadero y de cultivos *in vitro*.

A mis hermanos por su apoyo desde lo lejos.

A esa chica especial que llego casi al final de este capítulo de mi vida y me cautivó con su sencillez y su prudencia, sus ojos y sus palabras, gracias Marta por esos momentos que hemos compartido juntos durante la escritura de esta tesis, gracias por ayudarme a desconectar un poco, por airearme en los momentos más oscuros.

Y quisiera agradecer sobre todo a mis hijos, Juan Manuel y Piero Andrés, por estos años alejados de ellos y perderme parte de su crecimiento, perderme esa infancia maravillosa y parte de esa juventud llena de preguntas, espero me perdonen, porque para mi esos años jamás se recuperarán.

## ABSTRACT

PHOR1 was isolated because of its up-regulated expression in leaves of potato plants grown under short days and it encodes a U-box/ARM-repeat protein with a role in GA signalling. Antisense-PHOR1 potato lines exhibited a semi-dwarf phenotype, altered feed-back regulation of the GA biosynthetic genes and a reduced response to GA application, indicating a positive function of this protein in GA signalling. Sub-cellular localization of a PHOR1 fusion to the green fluorescent GFP protein showed an association of the protein to late endosomes and a GA-dependent migration into the nucleus. Here, we show that PHOR1 is an E3 ubiquitin ligase and that specifically binds the DELLA repressors in living plant cells. PHOR1 mediates U-box dependent auto-ubiquitylation and induces DELLA-dependent destabilization of these repressors. PHOR1 over-expression partially suppresses the dwarf phenotype conferred by the *sly1.10* mutant, impaired in the SCF<sup>SLY1</sup> DELLA-ubiquitylating activity and recovers the germination phenotype of this mutant. *PHOR1*-OE seeds in a wild-type background were also found to germinate more efficiently and to be more resistant to the inhibitory effects of PAC. Accumulation of the DELLA repressors is reduced in *PHOR1*-OE *sly1.10* lines, evidencing a function of the U-box protein PHOR1 in DELLA repressor destabilization *in vivo*. However, growth was not recovered in these lines, suggesting a function of PHOR1 in a GA signaling branch involved in regulation of a response different from cell elongation. RNA profiling studies evidenced a strong induction of the Arabidopsis orthologs in response to the flagellin elicitor and *Pseudomonas* infection, which might be indicative of a role in defense. DELLAs have been in fact reported to modulate the basal immunity response increasing susceptibility to biotrophic pathogens. Consistent with these observations, we show that PHOR1 over-expressers exhibit a reduced response to the elicitor flg22 and are more resistant to *Pseudomonas syringae* DC3000 infection. Null mutants in all DELLA repressor genes (*global*) were also more resistant to flg22 treatment, whereas mutant lines still exhibiting an active copy of the RGL3 repressor (*tetra*) showed a similar to wild-type or even increased response to this elicitor. This points to a main function of RGL3 in defense, thus assigning a function to this DELLA homolog whose function was unknown. We propose that PHOR1 promotes ubiquitylation and proteasomal

degradation of the DELLA repressors through an SCF<sup>SLY1</sup> complex-independent pathway and that this U-box E3 ligase integrates both GA and elicitor signals, playing a major role in modulating the basal immunity response to biotrophic and necrotrophic pathogens.

## ***ÍNDICE.***

<b>ABREVIATURAS.</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN.</b>	<b>4</b>
<b>1.- LAS GIBERELINAS (GAs).</b>	<b>4</b>
1.1.- METABOLISMO DE GAs.	4
1.1.1.- Biosíntesis y catabolismo de GAs.	5
1.1.2.- Mutantes de biosíntesis de GAs.	8
1.2.- REGULACIÓN DE LOS NIVELES ENDÓGENOS DE GAs.	9
1.3.- TRANSPORTE DE GAs.	10
1.4.- TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL DE GAs.	10
1.4.1.- Receptor de GAs.	11
1.4.2.- Reguladores de la señal de GAs.	11
a. Los represores DELLA.	12
b. El complejo SCF <sup>SLY</sup> en la regulación de la señal de GAs.	15
1.4.3.- Otras señales hormonales implicadas en la regulación de los represores DELLA.	16
<b>2.- EL PROTEASOMA 26S Y SUS COMPONENTES.</b>	<b>17</b>
2.1.- DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL SISTEMA PROTEASOMA 26S.	18
2.2.- SEÑALIZACIÓN POR UBIQUITINACIÓN.	21
<b>3.- SISTEMA INMUNE DE LAS PLANTAS.</b>	<b>22</b>
<b>4.- BALANCE HORMONAL DURANTE LA REACCIÓN         DE DEFENSA.</b>	<b>24</b>
<b>5.- E3 LIGASAS COMO COMPONENTES ESPECÍFICOS EN         LA DEFENSA DE PLANTAS.</b>	<b>25</b>
<b>6.- PHOR1.</b>	<b>28</b>

<b>OBJETIVOS.</b>	<b>31</b>
1.- OBJETIVOS GENERALES.	31
2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	31
<b>MATERIALES Y METODOS.</b>	<b>33</b>
1.- MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS.	33
2.- GENERACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS.	34
3.- EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.	35
3.1.- PURIFICACIÓN DE PHOR1-ST.	36
3.2.- PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN A GST.	36
4.- ANÁLISIS POR WESTERN BLOT.	37
5.- ANALISIS POR NORTHERN BLOT.	37
6.- ENSAYO DE INTERACCIÓN DE LAS DELLA CON PHOR1.	38
6.1.- TRADUCCIONES <i>IN VITRO</i> .	38
6.2.- ENSAYOS DE PULL-DOWN.	39
7.- AMPLIFICACIÓN Y CLONAJE DE RGA Y SUS DIFERENTES FRAGMENTOS DERIVADOS.	39
8.- TRADUCCIÓN <i>IN VITRO</i> Y ENSAYOS DE INTERACCIÓN PULL-DOWN DE LOS FRAGMENTOS DE RGA.	41
9.- ENSAYOS DE UBIQUITINACIÓN <i>IN VITRO</i> .	42
10.- INTERACCIÓN DE PHOR1 CON GIBERELINAS.	42
11.- ESTUDIOS DE LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PHOR1-GFP.	43
12.- ENSAYOS DE UNA ASOCIACIÓN DE PHOR1 AL SISTEMA DE ENDOMEMBRANAS.	44
13.- GRADIENTE DE SACAROSA Y COLOCALIZACIÓN CON EL MARCADOR LIPOFÍLICO FM4-64.	44
14.- COMPLEMENTACIÓN BIMOLECULAR FLUORESCENTE.	46
15.- PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ANTICUERPO ANTI-DELLA.	47



16.- ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DE LOS NIVELES ENDÓGENOS DE LAS PROTEÍNAS DELLA.	48
17.- INFECCIONES DE PLANTAS CON PATÓGENOS BIÓTROFOS Y NECRÓTROFOS.	48
<b>RESULTADOS.</b>	50
1.- CONSERVACIÓN DE LA FUNCIÓN DE PHOR1 EN <i>Arabidopsis</i> .	50
1.1.- IDENTIFICACIÓN DE LOS ORTÓLOGOS DE PHOR1 EN <i>Arabidopsis</i> .	50
1.2.- MIGRACIÓN AL NÚCLEO DEPENDIENTE DE GAS DE LA FUSIÓN PHOR1-GFP EN <i>Arabidopsis</i> .	51
2.- ASOCIACIÓN DE PHOR1 A MEMBRANAS VESICULARES.	52
2.1.- PHOR1 ES UNA PROTEÍNA PERIFÉRICA DE MEMBRANA.	52
2.2.- PHOR1 ESTA ASOCIADA A ENDOSOMAS DE ALTA DENSIDAD.	54
2.3.- PHOR1 ESTA ASOCIADA A VESÍCULAS DE TRÁFICO INTRACELULAR.	55
3.- EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.	58
3.1.- PHOR1::Step- tag.	59
3.2.- FUSIONES DE LAS PROTEÍNAS <i>BrARC1</i> , <i>AtSLY1</i> , <i>OsGID1</i> , <i>AtGAI</i> , <i>AtPUB27</i> , <i>AtPUB28</i> Y <i>AtPUB29</i> A GST.	59
4.- INTERACCIÓN DE PHOR1 Y SUS ORTÓLOGOS DE <i>Arabidopsis</i> CON LA PROTEÍNA REPRESORA RGA.	61
4.1.- INTERACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS PHOR1 Y RGA EN ENSAYOS <i>PULL-DOWN</i> .	61
4.2.- IDENTIFICACIÓN DE LOS DOMINIOS DE LA PROTEÍNA RGA RECONOCIDOS POR PHOR1.	62
4.3.- PHOR1 INTERACCIONA CON RGA <i>IN VIVO</i> .	64
5.- ACTIVIDAD E3 LIGASA DE PHOR1.	65
6.- ENSAYO DEGRADACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LAS PROTEÍNAS DELLA.	66
7.- INTERACCIÓN DE PHOR1 CON GAS.	67

8.- PRODUCCIÓN DE UN ANTICUERPO POLICLONAL anti-DELLA.	69
8.1.- EXPRESIÓN DEL ANTÍGENO UTILIZADO PARA LA PRODUCCIÓN DEL ANTICUERPO.	69
8.2.- PURIFICACIÓN Y TITULACIÓN DEL ANTICUERPO.	71
9.- FENOTIPOS CAUSADOS POR LA SOBRE-EXPRESIÓN DE PHOR1.	73
10.- PHOR1 RECUPERA PARCIALMENTE EL FENOTIPO ENANO DEL MUTANTE <i>sly1-10</i> .	74
11.- FUNCIÓN DE PHOR1 EN LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE DEFENSA.	75
11.1.- LOS GENES ORTÓLOGOS PUB DE <i>Arabidopsis</i> SE INDUCEN TRAS EL TRATAMIENTO CON ELICITORES.	75
11.2.- LAS LÍNEAS PHOR1-OE SON RESISTENTES A LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE LA RAÍZ INDUCIDA POR flg22.	77
11.3.- LAS PROTEÍNAS DELLA MEDIAN LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE LA RAÍZ TRAS EL TRATAMIENTO CON flg22.	78
11.4.- LAS LÍNEAS PHOR1-OE SON MÁS RESISTENTES A INFECCIONES POR EL PATÓGENO BIÓTROFO <i>Pseudomonas syringae</i> (PstDC3000) Y MÁS SUSCEPTIBLES AL HONGO NECRÓTROFO <i>Botrytis cinerea</i> .	81
<b>DISCUSIÓN.</b>	84
1.- LA FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA PHOR1 DE PATATA ESTÁ CONSERVADA EN <i>Arabidopsis</i> .	84
2.- PHOR1 ESTA ASOCIADA A LA MEMBRANA DE VESÍCULAS IMPLICADAS EN TRÁFICO INTRACELULAR.	84
3.- PHOR1 INTERACCIONA CON RGA A TRAVÉS DEL DOMINIO CONSERVADO DELLA.	85
4.- PHOR1 ES UNA E3 LIGASA CAPAZ DE UBIQUITINAR LAS PROTEÍNAS REPRESORAS DELLA <i>IN VITRO</i> .	87

5.- LA SOBRE-EXPRESIÓN DE PHOR1 CONFIERE UNA MAYOR RESISTENCIA A PAC EN LÍNEAS SILVESTRES Y UNA RESPUESTA MAYOR A GAS EN LOS MUTANTES <i>gal-3</i> .	88
6.- LA SOBRE-EXPRESIÓN DE PHOR1 REVIERTE PARCIALMENTE EL FENOTIPO ENANO CONFERIDO POR LA MUTACIÓN <i>sly1-10</i> .	88
7.- FUNCIÓN DE PHOR1 Y SUS HOMÓLOGOS DE <i>Arabidopsis</i> EN LA RESPUESTA DE INMUNIDAD BASAL INDUCIDA POR FLAGELINA.	89
8.- LOS REPRESORES DELLA Y LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN POR <i>flg22</i> .	90
9.- PHOR1 PROMUEVE LA RESISTENCIA A PATÓGENOS BIÓTROFOS E INDUCE LA SUSCEPTIBILIDAD A NECRÓTROFOS.	91
<b>CONCLUSIONES.</b>	94
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	96
<b>ANEXOS.</b>	107

## ***ABREVIATURAS.***

## ABREVIATURAS.

aa:	aminoácidos.
ABA:	ácido abscísico.
ACRE189:	proteína F-box implicada en defensa.
ACRE276:	proteína U-box/ARM repeat implicada en defensa.
<i>abi1-1</i> :	mutante insensible a ácido abscísico.
AFB2/3:	<i>auxin signaling F-Box proteins 2 and 3</i> (parálogos funcionales de TIR1).
<i>ARC1</i> :	U-box/ARM repeat de <i>Brassica napus</i> .
<i>ATL2/6</i> :	miembros de una familia multigénica que codifican proteínas RING-H2 zinc-finger con actividad E3 ligasa.
ATP:	adenosina trifosfato.
Avr:	efector patogénico o factor de avirulencia.
BFA:	brefeldina A.
BRI1:	receptor de brasinosteriodes.
BY2:	células de tabaco utilizadas en cultivos celulares.
<i>Cf4/9</i> :	genes implicados en resistencia al patógeno fúngico <i>Cladosporium fulvum</i> , cuyos productos génicos corresponden a proteínas con actividad E3 ligasa.
<sup>14</sup> C-GA <sub>1</sub> :	giberelina 1 marcada radiactivamente con el isótopo <sup>14</sup> C.
Cb:	carbenicilina.
CHRK1:	Receptor de quitina.
Cm:	cloramfenicol.
CMPG1:	U-box/ARM repeat implicada en defensa y resistencia a enfermedades.
<i>Col-0</i> :	<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo <i>Columbia-0</i> .
COR:	fitotoxina Coronatina producida por <i>P. syringae</i> .
Cor <sup>-</sup> :	mutante de <i>P. syringae</i> incapaz de producir coronatina.
<i>ctr1-1</i> :	mutante de señalización en la ruta de etileno, caracterizado por presentar una respuesta triple (inhibición del crecimiento de la raíz, engrosamiento del hipocótilo y excesivo gancho apical) constitutiva.
CytD:	citocalasina D.
DAPI:	4', 6-diamidino-2-phenylindole.
DELLA:	dominio conservado en la región N-terminal de las proteínas RGA, GAI y RGLs.
DTT <sup>-</sup> :	dithiothreitol.
EDTA:	ácido etilen-diamino-tetraacético.
EGF-R:	<i>epidermal growth factor</i> (receptor del factor de crecimiento epidermico).
ER:	retículo endoplasmático.
ERF:	factores de transcripción implicados en la respuesta a etileno.
ET:	etileno.
FLS2:	<i>flagellin sensing 2</i> (receptor tipo LRR <i>kinase-like</i> del elicitor bacteriano flagelina).
<i>fls2-17</i> :	mutación puntual del dominio quina del receptor FLS2.
<i>flg22</i> :	péptido sintético de 22 aa del N-terminal de la flagelina.
FM4-64:	Colorante lipofílico que tiñe membrana plasmática.
FRK1:	<i>FLG22-INDUCED RECEPTOR-LIKE KINASE 1</i> .

<b>ga1-3:</b>	mutación en el gen biosintético <i>GA1</i> que codifica la actividad <i>ent</i> -copalil difosfato sintasa debida a una delección de 5.0 kb en este locus.
<b>GAs:</b>	giberelinas.
<b>GA<sub>3</sub>:</b>	ácido giberélico.
<b>GAI:</b>	<i>gibberellin insensitive</i> , miembro de la subfamilia DELLA.
<b>gai-1:</b>	mutación de carácter semidominante en el gen <i>GAI</i> , producida por una delección de 17-aa en el motivo DELLA.
<b>gai-t6:</b>	mutación en el gen <i>GAI</i> debida a la inserción de un elemento transponible <i>Ds</i> .
<b>GID1:</b>	GA-insensitive dwarf 1.
<b>GUS:</b>	glucoronidasa.
<b>GRAS:</b>	familia de proteínas específica de plantas. Su nombre deriva de los miembros <u>G</u> AI, <u>R</u> GA y <u>S</u> CR ( <i>scarecrow</i> ).
<b>GST:</b>	glutathione S transferasa.
<b>H<sub>2</sub>O-DEPC:</b>	agua tratada con dietilpirocarbonato.
<b>HR:</b>	<i>hypersensitive response</i> (respuesta hipersensible).
<b>IAA26/27:</b>	factores transcripcionales que regulan negativamente la respuesta a auxinas.
<b>INA:</b>	ácido 2,6-dicloroisonicotínico.
<b>IPTG:</b>	isopropil β-D-tiogalacto piranósido.
<b>JA:</b>	ácido jasmónico.
<b>KDa:</b>	kilodaltons.
<b>Km:</b>	kanamicina.
<b>LD:</b>	<i>long day</i> , fotoperiodo de día largo.
<b>Ler:</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo <i>Landsberg erecta</i> .
<b>MAMP:</b>	<i>microbe-associated molecular patterns</i> (patrones moleculares asociados a microbios).
<b>MG132:</b>	Inhibidor del proteasoma.
<b>MP:</b>	membrana plasmática.
<b>MVB:</b>	<i>multi-vesicular bodies</i> (cuerpos multi-vesiculares).
<b>MWM:</b>	marcador de peso molecular de proteínas.
<b>NADPH:</b>	nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato reducida.
<b>NPR1:</b>	<i>non-expresser of PR genes</i> , proteína reguladora.
<b>ORF:</b>	<i>open reading frame</i> (pauta abierta de lectura).
<b>PAA:</b>	gel de poliacrilamida.
<b>PAC:</b>	paclobutrazol, inhibidor de la síntesis de GAs.
<b>PAMP:</b>	<i>pathogen-associated molecular patterns</i> (patrones moleculares asociados a patógenos).
<b>PHOR1:</b>	<i>photoperiod responsive</i> 1.
<b>PMSF:</b>	fluoruro de fenil-metil-sulfonil.
<b>PR:</b>	genes relacionados con patogenicidad.
<b>PSV:</b>	<i>protein storage vesicle</i> (vesícula de almacenamiento de proteínas).
<b>PUB:</b>	<i>plant U-Box</i> (U-box específicas de plantas).
<b>PVC:</b>	<i>pre-vacuolar compartment</i> (compartimento pre-vacuolar).
<b>RGA:</b>	<i>repressor of ga1-3</i> , miembro de la subfamilia DELLA.
<b>RGL1/ 2/ 3:</b>	<i>RGA-like</i> 1, 2, 3, miembros de la subfamilia DELLA.
<b>rga-24:</b>	mutación en el gen <i>RGA</i> producida por una delección en este locus.

<i>rga-Δ17</i> :	mutación en el gen <i>RGA</i> generada por una delección de 17-aa en el dominio DELLA, idéntica a la observada en el mutante <i>gai-1</i> .
ROS:	especies reactivas de oxígeno.
RRL:	<i>reticulocyte rabbit lysate</i> . (lisado de reticulocito de conejo).
RT:	<i>room temperature</i> (temperatura ambiente).
<sup>35</sup> S-Met:	metionina marcada con el isótopo <sup>35</sup> S.
SA:	ácido salicílico.
SAR:	<i>systemic acquired resistance</i> (resistencia sistémica adquirida).
SD:	<i>short day</i> , fotoperiodo de día corto.
SD+NB:	<i>short day + night break</i> , fotoperiodo de día corto con interrupción de la noche.
<i>sid1</i> :	mutante deficiente en la biosíntesis de ácido salicílico.
<i>sln</i> :	mutante alargado o <i>slender</i> .
<i>SLY1</i> :	<i>sleepy1</i> . Sub-unidad F-box del complejo SCF-box.
<i>sly1-10</i> :	mutación en el gen <i>SLY1</i> que produce una pérdida de 8 aa en el extremo C-terminal de la proteína.
Sm:	estreptomizina.
Sp:	espectinomizina.
SPL1:	SPOTTED LEAF11. U-box de arroz implicada en defensa.
TCA:	ácido tricloroacético.
TGN:	<i>trans-golgi network</i> (Red trans-golgi).
TIR1:	<i>transport inhibitor response 1</i> (receptor de auxinas).
TLR5:	<i>Toll-like receptor 5</i> (miembro de la familia de receptores Toll que juegan un papel clave en la activación y regulación de las respuestas inmunes innatas y adaptativas).
TMV:	<i>tobacco mosaic virus</i> (virus del mosaico del tabaco).
TM X2:	tampón de carga de proteínas + β-mercaptoetanol.
TnT:	sistema de transcripción y traducción <i>in vitro</i> .
TX-100:	Tritón X-100.
Ub:	ubiquitina.
VIGS:	silenciamiento génico inducido por virus.
WGL:	<i>wheat germ lysate</i> (lisado de germen de trigo).
WRKY:	familia de factores transcripcionales implicados en defensa.
<i>Ws</i> :	<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo <i>Wassilewskija</i> .
WT:	plantas silvestres o <i>wild-type</i> .
26S:	proteasoma 26S.

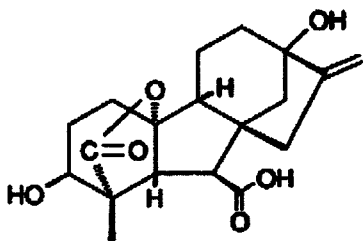
## ***INTRODUCCIÓN.***



# INTRODUCCIÓN.

## 1.- LAS GIBERELINAS (GAs).

Las hormonas giberelinas (GAs) agrupan un conjunto de compuestos diterpenoides tetracíclicos con una estructura común de anillos *ent*-giberélico y con grupos radicales distintos que determinan la actividad biológica de la molécula. (Fig. 1). Las GAs regulan multitud de procesos esenciales durante el desarrollo de la planta, como la elongación y crecimiento del hipocótilo y el tallo, la germinación de las semillas, la expansión de los cotiledones y las hojas, el desarrollo de los tricomas, la floración y el desarrollo del fruto<sup>(3, 9, 13, 15, 25, 35, 45, 63, 100, 102, 103, 119, 120, 123, 152, 159, 168, 181)</sup>. Se conoce que estímulos medioambientales como la luz y la temperatura, afectan también al crecimiento de la planta a través de cambios en la síntesis y/o respuesta a estas hormonas<sup>(1, 3, 20, 94, 162, 166, 181, 184, 187)</sup>.



**Figura 1.** Estructura tipo *ent*-giberélico de la molécula de giberelinas (GA). La presencia de un anillo  $\gamma$ -lactona y un hidroxilo en la posición C-3 son necesarias para la actividad biológica. Corresponde a la estructura de la GA<sub>1</sub>.

El notable incremento en la producción de los cultivos de cebada y arroz logrado en los años 60, conocido como “*revolución verde*”, se debió a la introducción de caracteres “enanizantes” que incrementaban la producción de grano de estas plantas. Actualmente, se ha demostrado que gran número de dichas mutaciones afectan a genes implicados en la síntesis ó respuesta a giberelinas, lo que demuestra la importante función que estas hormonas realizan<sup>(65, 109, 141, 151)</sup>.

Las GAs fueron una de las primeras hormonas vegetales identificadas<sup>(164)</sup> (Anexo 1). Estas moléculas fueron descubiertas en el año 1926 por el científico japonés Eiichi Kurosawa al estudiar la enfermedad “*bakanae*” del arroz que causa un crecimiento excesivo de la planta. Kurosawa descubrió que esta enfermedad era producida por el hongo *Fusarium fujikuroi* que sobre-produce estas hormonas, las cuales son responsables del crecimiento excesivo<sup>(151, 164, 167)</sup>. Desde su descubrimiento, se han descrito cerca de 136 moléculas distintas, tanto en plantas como en hongos<sup>(167)</sup>. A cada uno de estos compuestos se le ha asignado un número correlativo según el orden de su descubrimiento. Según el número de átomos de carbono de la molécula se han agrupado en C-20 GAs y C-19 GAs. Estas últimas han perdido el C-20 para formar un anillo  $\gamma$ -lactona necesario para la actividad biológica<sup>(66, 67)</sup>. De este modo, sólo una pequeña fracción de las GAs descritas corresponde a compuestos biológicamente activos, mientras que el resto corresponderían a precursores de síntesis o metabolitos del catabolismo<sup>(67, 120, 161)</sup>. Mutantes defectivos en la acumulación de estas hormonas han sido identificados en multitud de especies de plantas<sup>(26, 66, 132, 140, 147, 160, 163)</sup>. Estos se caracterizan por presentar un fenotipo enano o semi-enano, de hojas verde oscuras y fertilidad reducida, que es revertido al fenotipo silvestre, tras la aplicación exógena de GAs.

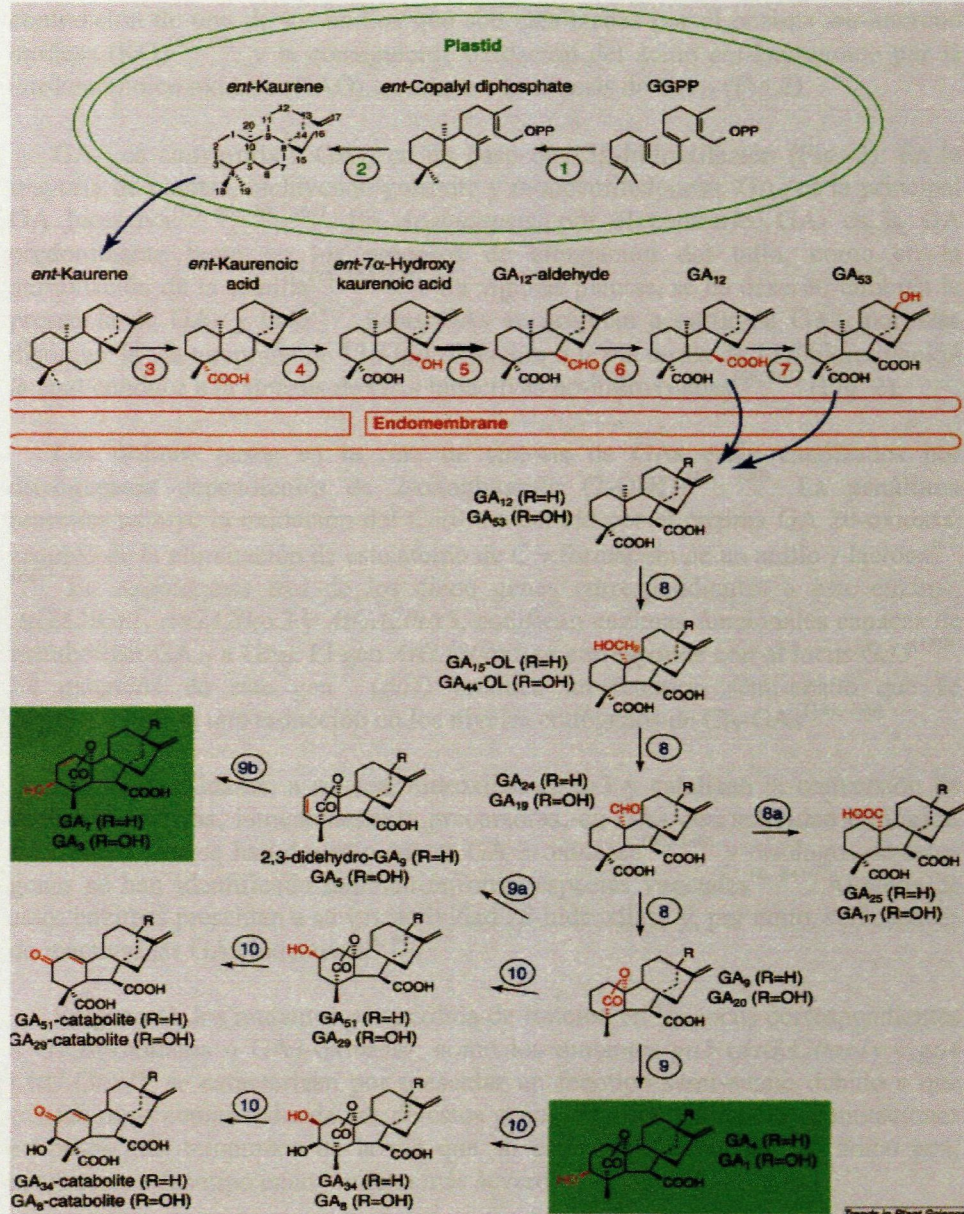
## 1.1.- METABOLISMO DE GAs.

En los últimos 50 años se han identificado prácticamente la totalidad de los genes responsables de la biosíntesis de estas hormonas y de los pasos iniciales de su catabolismo<sup>(8, 39, 66, 95, 99, 120, 147, 160, 161, 163, 164)</sup>. Análisis cuantitativos basados en el uso de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) han revelado que las GAs son especialmente abundantes en tejidos en crecimiento ó elongación, como los ápices de los tallos, las hojas jóvenes y las flores<sup>(95)</sup>. Fusiones al gen reportero glucuronidasa (GUS) han demostrado que los genes correspondientes a los enzimas GA 20-oxidasa y GA 3-oxidasa, que catalizan los últimos pasos de síntesis, se expresan a niveles muy elevados en el epitelio y tallo del embrión de arroz<sup>(95)</sup>. Otros estudios han demostrado también una expresión tejido-específica de estos genes, coincidiendo con zonas en crecimiento ó elongación. Esto sugiere que las GAs bioactivas se acumularían en los órganos y tejidos que expresan estos genes<sup>(24, 26, 84, 85, 102, 119, 132, 140, 183, 184)</sup>.

### 1.1.1.- Biosíntesis y catabolismo de GAs.

El primer paso en la ruta de síntesis de las GAs es la ciclación del geranilgeranil difosfato (GGPP) a *ent*-copalil difosfato (CPP). En plantas, esta reacción está catalizada por el enzima *ent*-copalil difosfato sintasa (CPS), una diterpeno ciclasa<sup>(67, 120)</sup> localizada en los plastidios (Fig. 2)<sup>(39, 72, 158, 160)</sup>. En *Arabidopsis* este enzima, está codificado por un único gen (*GAI*)<sup>(160)</sup> y en consecuencia, los mutantes con una pérdida de función en dicho gen (*gal-3*) presentan un fenotipo enano severo<sup>(66, 67, 158, 160)</sup>.

El segundo paso de síntesis corresponde a la formación de *ent*-kaureno a partir del *ent*-copalil difosfato (CPP) y es catalizado por el enzima *ent*-kaureno sintasa (KS), que es también una terpeno ciclasa. Este enzima cataliza las reacciones de ciclación necesarias para producir la estructura tetracíclica *ent*-kaureno característica de las GAs (Figs. 1 y 2). Al igual que la CPS, la KS está codificada en *Arabidopsis* por un único gen (*GA2*)<sup>(67, 183)</sup> cuya mutación (*ga2-1*) da lugar a un fenotipo enano severo similar al de los mutantes *gal-3*. La sobre-expresión de este gen no produce un aumento en los niveles endógenos de GAs ni da lugar a un fenotipo alargado, lo que indicaría que la actividad CPS es uno de los pasos limitantes en la vía de síntesis<sup>(9)</sup>.



**Figura 2.** Ruta principal de metabolismo de las GAs en plantas superiores. Los enzimas implicados muestran una compartimentalización subcelular en los plastidios, el sistema de endomembranas y el citoplasma. Los grupos funcionales que se introducen o modifican en cada etapa son indicados en rojo y las GAs biológicamente activas se muestran resaltadas en verde. Los enzimas que catalizan estas reacciones son: (1) *ent*-copalil difosfato sintasa (CPS); (2) *ent*-kaureno sintasa (KS); (3) *ent*-kaureno 19-oxidasa (EKO); (4) ácido *ent*-kaurenoico-7 $\beta$ -hidroxilasa; (5) GA<sub>12</sub>-aldehído sintasa; (6) GA 7-oxidasa (GA7ox); (7) GA 13-hidroxilasa (GA13ox); (8) GA 20-oxidasa (GA20ox); (9) GA 3 $\beta$ -hidroxilasa (GA3ox); (10) GA 2-oxidasa (GA2ox). La GA20ox de semillas de calabaza (8a), cataliza los tres pasos de oxidación de GA<sub>12</sub> a GA<sub>25</sub> y de GA<sub>53</sub> a GA<sub>17</sub>. La biosíntesis de GA<sub>7</sub> a partir de GA<sub>9</sub> y GA<sub>3</sub> a partir de GA<sub>20</sub> (9a,b) estaría catalizada por un subgrupo de GA 3-oxidasas. GA<sub>15</sub>-OL y GA<sub>44</sub>-OL corresponden a las formas lactona abiertas de las GAs C-20 hidroxiladas, GA<sub>15</sub> y GA<sub>44</sub>. Adaptado de Hedden, P. y Phillips, A. L., **Trends in Plant Science** (2000).



Posteriormente, sucesivas oxidaciones del *ent*-kaureno, seguidas de la contracción de uno de los anillos que son catalizadas por el enzima *ent*-kaureno oxidasa (KO)<sup>(66, 67)</sup>, y la consiguiente oxidación del ácido *ent*-kaurenoico por la *ent*-kaurenoico oxidasa (KAO), conduce a la síntesis de GA<sub>12</sub> (Fig.2).

GA<sub>12</sub> es convertida a GA<sub>53</sub> en un paso de 13 $\beta$ -hidroxilación (Fig. 2). En la mayoría de plantas, incluyendo guisante y monocotiledóneas, GA<sub>1</sub> es la principal GA bioactiva<sup>(13, 66, 84, 162)</sup>. En *Arabidopsis*, por el contrario, GA<sub>4</sub> es la GA predominante tanto en los procesos de elongación del tallo, como en la germinación de la semilla<sup>(24, 161, 179)</sup>. En algunas plantas, se ha descrito también la presencia de GA<sub>3</sub> y GA<sub>7</sub><sup>(67)</sup>. Estas GAs se originan a partir de GA<sub>12</sub> por vías distintas: la vía temprana de 13 $\beta$ -hidroxilación ó la vía tardía de 13 $\beta$ -hidroxilación la cual conduce a la síntesis de GAs bioactivas no-hidroxiladas<sup>(66, 161)</sup> (Fig. 2).

Los últimos pasos en la ruta de síntesis de GAs están catalizados por dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (2-ODD)<sup>(67, 120)</sup>. La penúltima reacción incluye la oxidación del C-20 a aldehído por el enzima GA 20-oxidasa, seguido de la eliminación de este átomo de C y formación de un anillo  $\gamma$ -lactona<sup>(67, 164)</sup>. En *Arabidopsis* tres de los cinco genes correspondientes a este enzima, *AtGA20ox1*, *AtGA20ox2* y *AtGA20ox3*, codifican enzimas funcionales capaces de metabolizar GA<sub>12</sub> a GA<sub>9</sub>. El gen *AtGA20ox1* se corresponde con el locus *GA5*<sup>(180)</sup>. La mutación de este gen (*ga5*) produce un fenotipo semi-enano que se correlaciona con una reducción en los niveles endógenos de C<sub>19</sub>-GAs<sup>(161, 180)</sup>.

Las GA3-oxidasa, a su vez, hidroxilan el C-3 y catalizan la conversión de especies inactivas, inmediatamente precursoras, en GAs con actividad biológica. En *Arabidopsis* se han descrito cuatro GA 3-oxidasa<sup>(67, 140)</sup> y ortólogos de estos genes se han identificado también en otras especies vegetales<sup>(8, 84)</sup>. Algunos de estos enzimas presentan a su vez actividad 2 $\beta$ -hidroxilasa y, por tanto, son capaces de inactivar las GAs bioactivas<sup>(8, 90)</sup>.

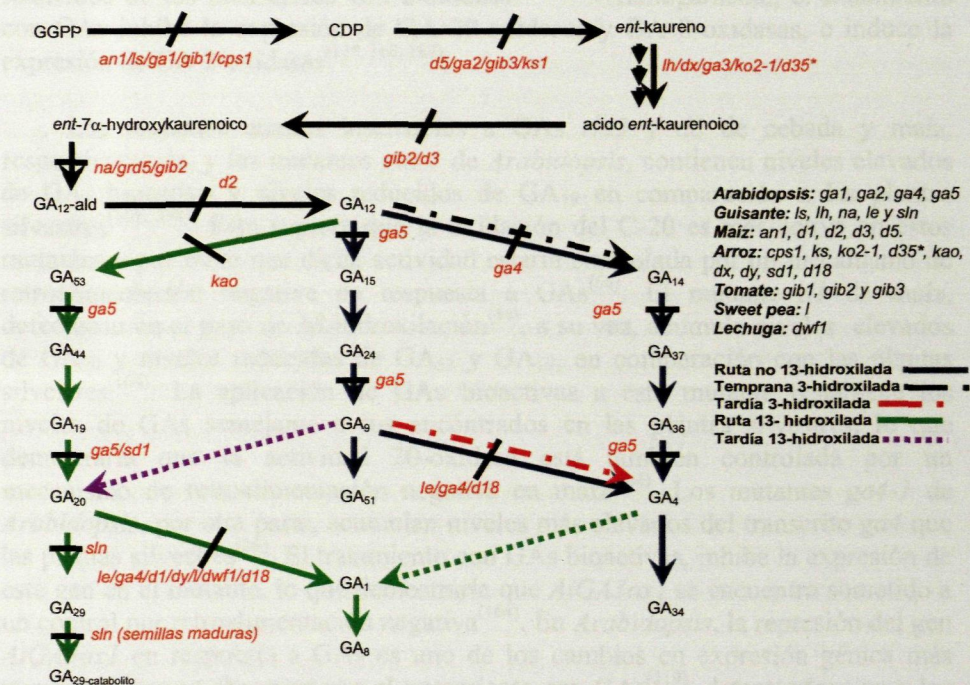
En general, los mutantes por pérdida de función en los locus correspondientes a GA20-oxidasa ó GA3-oxidasa, como los mutantes *ga5* (*AtGA20ox1*) y *ga4* (*AtGA3ox1*), se caracterizan por presentar un fenotipo semi-enano debido a que existen otras copias redundantes de estos genes. Ello los diferencia de mutaciones en pasos más tempranos de la vía que, al estar codificadas por un único gen, producen un fenotipo enano mucho más severo<sup>(164)</sup>.

Los niveles de GAs bioactivas están también controlados por la velocidad de inactivación de estas hormonas, debido a la conjugación de un grupo glucosil o por 2 $\beta$ -hidroxilación de la molécula activa<sup>(164)</sup>. La importancia de la 2 $\beta$ -hidroxilación en la regulación de los niveles de GAs bioactivas está bien establecida<sup>(67, 69, 120, 140, 147)</sup>. En *Arabidopsis* existen siete copias de los genes GA2-oxidasa<sup>(147)</sup> y su actividad es abundante en semillas durante los estadios tardíos de maduración<sup>(164)</sup>. En ciertas especies, incluyendo las leguminosas, las GAs 2 $\beta$ -hidroxiladas son posteriormente metabolizadas a otros catabolitos<sup>(67, 69, 163)</sup> (Fig. 2). La evidencia de que estos enzimas participan *in vivo* en la inactivación de GAs bioactivas, proviene de experimentos en *Arabidopsis* que demostraron que la sobre-expresión de estos genes produce un fenotipo enano<sup>(147, 164)</sup>.



1.1.2.- Mutantes de biosíntesis de GAs.

La modificación del crecimiento y desarrollo de la planta por aplicación de productos que alteran los niveles endógenos de GAs es una práctica común en agricultura. Los inhibidores de la síntesis de GAs se utilizan con frecuencia para retardar el crecimiento de plántulas en semilleros y controlar la estatura de cereales y de plantas de uso ornamental<sup>(23, 151)</sup>. Una alternativa a la aplicación de estos productos es la modificación del contenido endógeno de GAs por manipulación genética de los genes biosintéticos<sup>(16, 37, 68)</sup>. Hasta la fecha, se han identificado un número considerable de mutantes que afectan distintos pasos de la ruta de síntesis en varias especies vegetales<sup>(24, 26, 66, 67, 84, 138, 140, 141, 144, 158, 160, 161, 163, 180, 183)</sup> (Fig. 3).



**Figura 3.** Mutantes en la ruta de biosíntesis de GAs en *Arabidopsis* y otras plantas. En la leyenda de la derecha se especifica las especies para las cuales se han identificado mutantes, indicando la ruta bloqueada por la mutación. \*El mutante *d35*, corresponde a una pérdida de función en el gen *OsKAO2*. Adaptado de Ross, J. y col. *Physiologia Plantarum* (1997).

El mutante *na* de guisante, por ejemplo, corresponde a una pérdida de función del gen *PsKAO1* y presenta un fenotipo enano severo, pero un desarrollo normal de la semilla<sup>(29)</sup>. Los mutantes *grd5* de cebada, al igual que los mutantes *na* de guisante, se caracterizan por presentar una reducida actividad KAO y un fenotipo enano que puede ser recuperado por aplicación de GAs<sup>(29, 71)</sup>. Mutantes enanos con un bloqueo a nivel de la KAO, sin embargo, no se han aislado en *Arabidopsis*, lo que sugiere la existencia de dos copias redundantes del gen. El mutante *dwarf3* (*d3*) de maíz posee también un fenotipo deficiente en GAs, semejante al mutante *na*, aunque el paso preciso bloqueado en este mutante no ha sido identificado<sup>(164)</sup>. Los mutantes de arroz, bloqueados en los genes que codifican las etapas tempranas de biosíntesis de GAs (*OsCPS*, *OsKS*, *OsKO*, *OsKAO*) muestran



fenotipos enanos severos, y un desarrollo deficiente de la flor y de las semillas, a excepción del mutante *d35 (Osko2-2)*<sup>(88, 140)</sup>. En contraposición a estos mutantes que afectan pasos tempranos de síntesis, los mutantes con un bloqueo a nivel de los enzimas GA 20-oxidasa y GA 3-oxidasa, muestran un fenotipo semi-enano mucho más suave.

## 1.2.- REGULACIÓN DE LOS NIVELES ENDÓGENOS DE GAs.

Los niveles endógenos de GAs están regulados por retroalimentación positiva y negativa<sup>(66, 67)</sup>. Así, las plantas tratadas con inhibidores de la síntesis de GAs como *paclobutrazol* muestran niveles elevados de los mensajeros correspondientes a los enzimas GA 20-oxidasa y GA 3-oxidasa y niveles reducidos de los mensajeros GA 2-oxidasa<sup>(26, 163)</sup>. Análogamente, el tratamiento con GAs inhibe la expresión de GA 20-oxidasa y GA 3-oxidasa, e induce la expresión de GA 2-oxidasa<sup>(125, 163, 182)</sup>.

Los mutantes enanos insensibles a GAs *rht3* y *d8* de cebada y maíz, respectivamente, y los mutantes *gai-1* de *Arabidopsis*, contienen niveles elevados de GA<sub>1</sub> bioactiva y niveles reducidos de GA<sub>19</sub> en comparación a las plantas silvestres<sup>(161, 164)</sup>. Esto sugiere que la oxidación del C-20 es más activa en estos mutantes y por tanto que dicha actividad estaría controlada por un mecanismo de retroalimentación negativa en respuesta a GAs<sup>(66)</sup>. El mutante *d1* de maíz, defectuoso en el paso de 3β-hidroxilación<sup>(44)</sup>, a su vez, acumula niveles elevados de GA<sub>20</sub> y niveles reducidos de GA<sub>53</sub> y GA<sub>19</sub>, en comparación con las plantas silvestres<sup>(164)</sup>. La aplicación de GAs bioactivas a este mutante restablece los niveles de GAs semejante a los encontrados en las plantas silvestres, lo que demostraría que la actividad 20-oxidasa está también controlada por un mecanismo de retroalimentación negativa en maíz<sup>(164)</sup>. Los mutantes *ga4-1* de *Arabidopsis*, por otra parte, acumulan niveles más elevados del transcrito *ga4* que las plantas silvestres<sup>(26)</sup>. El tratamiento con GAs bioactivas, inhibe la expresión de este gen en el mutante, lo que demostraría que *AtGA3ox1* se encuentra sometido a un control por retroalimentación negativa<sup>(164)</sup>. En *Arabidopsis*, la represión del gen *AtGA3ox1* en respuesta a GAs es uno de los cambios en expresión génica más tempranos que se observan tras el tratamiento con GAs<sup>(119)</sup>, detectándose ya a los 30 min de la aplicación de GAs<sup>(164)</sup>. Sin embargo, en otras especies, la regulación de los genes GA 20-oxidasa ejerce un efecto mayor en la homeostasis de GA<sub>1</sub> y GA<sub>4</sub> que la de los genes GA 3-oxidasa<sup>(84)</sup>. La regulación negativa de los genes GA 20-oxidasa y GA 3-oxidasa es común a la mayoría de plantas superiores. A diferencia de estos genes tardíos, hasta la fecha no se han obtenido evidencias que sugieran que los genes correspondientes a los pasos tempranos de síntesis estén también controlados por un mecanismo de retroalimentación similar<sup>(164)</sup>.

La expresión de los genes GA 2-oxidasa, *AtGA2ox1* y *AtGA2ox2*, responsables de inactivar las GAs bioactivas, se induce fuertemente en los mutantes *gal-3* en respuesta al tratamiento con GAs exógenas<sup>(163)</sup>. Esta inducción no se produce, sin embargo, en los mutantes insensibles a GAs<sup>(164)</sup>, lo que demostraría que el catabolismo de GAs también están regulados por un mecanismo de retroalimentación positiva.

### 1.3.- TRANSPORTE DE GAS.

A pesar de los notables avances realizados en el estudio de los genes biosintéticos, apenas se dispone de información acerca de como estas hormonas se distribuyen a lo largo de la planta ó en que tejidos ocurre su síntesis mayoritaria. Los pocos trabajos publicados hasta la fecha relacionados con el movimiento de estas hormonas ó sus precursores se han basado en la generación de injertos entre plantas mutantes con un bloqueo en alguna de las etapas de síntesis y plantas silvestres<sup>(106, 130)</sup>. Así por ejemplo, Lockard y Grunwald demostraron en 1970 que la aplicación de GA<sub>1</sub> a los mutantes enanos *le* de guisante, con un bloqueo en el paso de 3 $\beta$ -hidroxilación, era capaz de revertir el fenotipo de estos mutantes, sin embargo su estatura no se recuperaba cuando se injertaban sobre bases silvestres *Le*<sup>(83, 106)</sup>. Esto sugería que GA<sub>1</sub> no se transportada en cantidad suficiente desde la base silvestre a la estaca injertada como para revertir su fenotipo. En cambio, el fenotipo enano de líneas mutantes *na*, con un bloqueo en uno de los pasos tempranos de síntesis<sup>1</sup>, podía ser recuperado tanto por la aplicación de GA<sub>1</sub> como tras su injerto sobre bases silvestres *Le Na* ó mutantes *le*. Ello sugería que el precursor GA<sub>20</sub> que se acumula en el mutante *le* ó bien precursores más tempranos también presentes en estas plantas son capaces de ser transportados desde la base y ser metabolizados a GA<sub>1</sub> en la estaca injertada<sup>(83)</sup>. Más recientemente, en el año 1992 Proebsting y col, confirmaron que el contenido en GAs bioactivas era mayor en las estacas *na* injertadas sobre bases *Na Le* o *Na le*, y que el precursor radioactivo GA<sub>20</sub> aplicado sobre las bases era transformado en sus respectivos metabolitos activos en la estaca injertada<sup>(130)</sup>. Estos resultados demostrarían que el precursor GA<sub>20</sub> es distribuido en la planta, mientras que GA<sub>1</sub> no es movilizado y permanece en las células donde es sintetizado.

### 1.4.- TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL DE GAS.

El aislamiento de mutantes con una respuesta alterada a GAs ha sido esencial en la identificación de los mecanismos de transducción que intervienen en la percepción y respuesta a estas hormonas y en la identificación de distintos intermediarios con una función clave en la ruta de señalización<sup>(66, 81, 120, 159, 164, 165)</sup>. Estos mutantes, identificados en distintas especies vegetales<sup>(15, 42, 66, 157)</sup>, se han agrupado según: (a) mutantes con una respuesta constitutiva a GAs, con un fenotipo alargado y hojas de color verde pálido, similar al de las plantas silvestres tratadas con dosis elevadas de GAs y (b) mutantes insensibles a GAs, con un fenotipo enano y hojas de color verde oscuro, germinación defectuosa de las semillas, y en algunos casos reducida fertilidad<sup>(80)</sup>, similar al de los mutantes con un bloqueo en la ruta de biosíntesis. Sin embargo, a diferencia de éstos, los mutantes insensibles no recuperan su fenotipo tras el tratamiento con GAs<sup>(43, 159, 164)</sup>. En el Anexo 2, se presenta un listado de los mutantes identificados hasta la fecha.

---

<sup>1</sup> Mutante de guisante en el gen *Na* que bloquea la conversión del ácido 7 $\alpha$ -ent-hidroxiokaurenoico en GA<sub>12</sub>-aldehído<sup>58</sup>.

### 1.4.1.- Receptor de GAs.

Ensayos bioquímicos realizados en aleurona de cebada habían sugerido la existencia de receptores de GAs en la membrana plasmática (MP). Así, en el año 1991 Hooley *y col.*, 1990, describieron un posible receptor de GAs, aislado a partir de la membrana plasmática de células de aleurona de avena<sup>(77)</sup>. En el año 1994, Gilroy y Jones confirmaron una posible localización, en la cara externa de la membrana plasmática de protoplastos de aleurona de cebada, de receptores de GAs y de ácido abscísico (ABA)<sup>(48)</sup>. Sin embargo, Nakajima *y col.*, en 1997 y Park *y col.*, en 2005, reportaron la identificación de proteínas solubles capaces de unir GAs, en la fracción citosólica de plántulas de judía<sup>(114, 121)</sup>. Ese mismo año, Ueguchi-Tanaka *y col.*, 2005, describieron la caracterización del gen *GID1* (*GA-insensitive dwarf 1*) de arroz, un gen con cierto grado de homología a la familia de lipasas sensibles a hormonas (HSL) de bacterias<sup>(170)</sup>. El mutante *gid1-1* de arroz presenta un fenotipo enano severo, y un bloqueo en el control por retroalimentación negativa del gen biosintético *SD1* (*OsGA20ox2*)<sup>(144)</sup>. Fusiones de la proteína *GID1* a GFP la localizan en el núcleo con una ligera señal en el citosol y su localización no varía tras el tratamiento con el inhibidor de biosíntesis *uniconazol* ó con GAs. *GID1* fusionada a GST es capaz de unir GAs bioactivas, pero no las formas inactivas de estas hormonas. Una versión mutada de *GID1*, por el contrario, carece de la capacidad de unir GAs. En este trabajo, se demostró también una interacción de *GID1* con el represor DELLA de arroz *OsSRL1*, y que la sobre-expresión de *GID1* genera un fenotipo hipersensible a GAs<sup>(170)</sup>. En *Arabidopsis* se han identificado tres genes homólogos a *GID1*<sup>(113)</sup>. Ensayos bioquímicos y de interacción proteína-proteína en levadura mostraron que las proteínas codificadas por estos genes, al igual que *GID1*, unen GAs bioactivas y las proteínas represoras DELLA<sup>(113)</sup>. Mutaciones triples nulas para los tres genes *AtGID* presentan también un fenotipo enano severo que no es revertido tras la aplicación de GAs, corroborando así la función de estas proteínas como receptores solubles de GAs. Sin embargo, estos resultados no descartan la existencia otros receptores unidos a la membrana plasmática<sup>(170)</sup>.

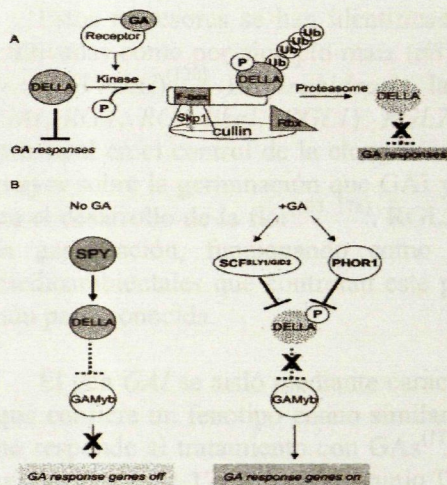
### 1.4.2.- Reguladores de la señal de GAs.

La unión de GAs a los receptores *GID* activa una ruta de señalización cuyo resultado final es la activación de la expresión de una serie de genes que, en último término, son los determinantes de la respuesta de crecimiento inducida por estas hormonas. Se ha identificado un número de componentes intermediarios de esta vía, observándose que éstos pueden actuar como reguladores positivos, favoreciendo el flujo de señalización, o como represores o reguladores negativos, ya que reprimen el flujo de señal en ausencia de GAs.



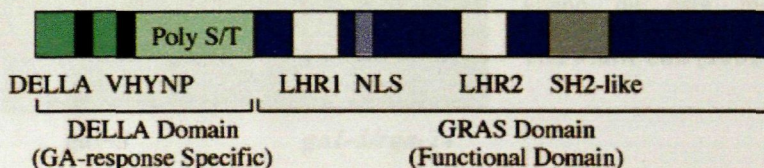
## a. Los represores DELLA.

Los represores DELLA ejercen una función principal en la ruta de GAs, al reprimir todas las respuestas mediadas por estas hormonas en ausencia de GAs<sup>(164)</sup> (Fig. 4).



**Figura 4.** Señalización de GAs. (A) Regulación de las proteínas DELLA. En ausencia de GAs, las DELLA inhiben la respuesta a GAs. La unión de GAs al receptor estimula una quinasa que fosforila estas proteínas para ser reconocidas por el complejo SCF<sup>SLY1</sup> el cual las poli-ubiquitina y marca su degradación por el 26S proteasoma. (B) Modelo de acción de las DELLA. En ausencia de GAs, las proteínas DELLA inhiben los factores transcripcionales GMYB. SPINDLY (SPY) estabilizaría estos represores mediante una modificación del tipo O-Glc-NAC. En presencia de GAs, las DELLA son reguladas negativamente por SCF<sup>SLY</sup> y posiblemente por PHOR1, permitiendo la activación de genes de respuesta a GAs. Adaptado de **Thomas y col. Vitamins & Hormones** (2005).

Estos represores pertenecen a la familia GRAS (*GAI-RGA-Scarecrow*) de factores de transcripción, específicos de plantas<sup>(131)</sup>. En *Arabidopsis* esta familia incluye más de 30 miembros, caracterizados por presentar un dominio C-terminal altamente conservado, o dominio GRAS, que incluye dos repeticiones de leucina (LHR), un dominio similar al dominio SH2 de unión a fosfotirosinas y una señal de localización nuclear (NLS)<sup>(87, 124, 131, 159)</sup>. Aparte de estos dominios conservados, los diferentes miembros de la familia presentan un dominio N-terminal divergente, que mediaría la función de estos diferentes miembros en distintas rutas de señalización. El dominio N-terminal DELLA es característico de la subfamilia de represores DELLA y comprende las regiones DELLA y VHYNP<sup>(122, 148)</sup> (Fig. 5). Deleciones ó sustituciones en este dominio confieren un fenotipo enano, insensible a GAs<sup>(15, 31, 87, 124)</sup>.



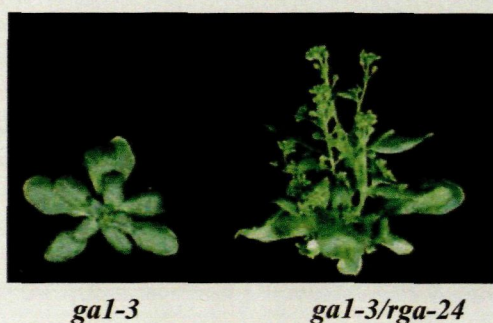
**Figura 5.** Subfamilia DELLA de proteínas GRAS. El dominio N-terminal "DELLA" incluye dos motivos altamente conservados, denominados DELLA y VHYNP, y una región poli-S/T. La región C-terminal es común a todos los miembros de la familia GRAS. Poli-S/T= motivo Ser/Thr; LHR= Leu heptad repeat; NLS= señal de localización nuclear. Según Sun T.P. y Gubler F., **Ann. Rev. Plant Biology** (2004).



Se ha postulado que las proteínas DELLA podrían actuar como factores de transcripción, pero hasta la fecha no se ha demostrado que éstas proteínas puedan unir directamente DNA y tampoco se ha visto que presenten un dominio de interacción característico, por lo que es posible que su función represora esté mediada a través de una interacción de tipo proteína-proteína con otros factores de transcripción<sup>(159)</sup>.

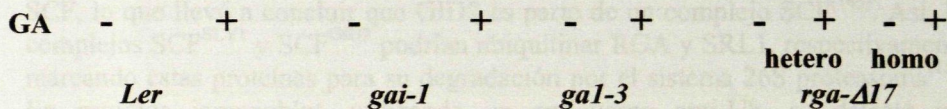
Estos represores se han identificado tanto en *Arabidopsis* como en especies cultivadas como por ejemplo maíz (*d8*), trigo (*Rht*), arroz (*SLR1*), cebada (*SLN1*) y vid (*VvGAI*)<sup>(120)</sup>. En *Arabidopsis*, la subfamilia DELLA incluye 5 miembros: *GAI*, *RGA*, *RGA-like1* (*RGL1*), *RGL2* y *RGL3*. *GAI* y *RGA* ejercen un papel principal en el control de la elongación del tallo. *RGL1* parece ejercer un control mayor sobre la germinación que *GAI* y *RGA*, y juega también un papel principal en el desarrollo de la flor<sup>(103, 176)</sup>. *RGL2* es el principal responsable del control de la germinación, funcionando como integrador de las señales endógenas y medioambientales que controlan este proceso<sup>(19, 103, 168)</sup>. La función de *RGL3* es aún poco conocida.

El gen *GAI* se aisló mediante caracterización del alelo semi-dominante *gai-1* que confiere un fenotipo enano similar al de los mutantes biosintéticos, pero que no responde al tratamiento con GAs<sup>(178)</sup> (Fig. 7). Dicha mutación es causada por una delección de 17 aa en el dominio DELLA, que hace que la proteína funcione como un represor constitutivo<sup>(122)</sup>. *RGA* en cambio se identificó en un cribado de mutantes que parcialmente recuperaban el fenotipo enano de los mutantes *gai-3*<sup>(150)</sup> (Figs. 6 y 7). Los mutantes nulos *gai-t6* o *rga-24* son de hecho recesivos y revierten parcialmente el fenotipo enano de los mutantes deficientes en GA o el producido por un tratamiento con paclobutrazol<sup>(59, 89, 122, 148, 157)</sup>. Ello evidenciaría una función central de estas proteínas como represores de la ruta señalización de GAs, lo que llevó a postular que las GAs se unirían de manera directa ó indirecta a estas proteínas, contrarrestando su actividad represora.



**Figura 6.** Fenotipo del mutante biosintético *gai-3* y del mutante *rga-24* en el fondo *gai-3* (*rga-24/gai-3*). La mutación *rga-24* revierte parcialmente el fenotipo enano de este mutante. Según Silverstone A. y col. **The Plant Cell** (2001).





**Figura 7.** Fenotipo de los mutantes *gai-3*, deficientes en GAS, y *gai-1* ó *rga-Δ17*, insensibles a GAS. La delección de 17 aa en el dominio DELLA de la proteína RGA confiere un fenotipo semi-dominante insensible a GAS, similar al del mutante *gai-1*. Efecto sobre la elongación del tallo del tratamiento con GA<sub>3</sub> de plantas control, mutantes y transgénicas para la construcción *rga-Δ17*. El fenotipo enano conferido por la construcción *rga-Δ17* se observa tanto en líneas heterocigotas como homocigotas. Según Dill A. y col. **PNAS** (2001).

Aunque GAI y RGA ejercen funciones que parcialmente solapan, RGA tendría un efecto mayor que GAI en la represión de la señal de GAS. Así por ejemplo, mutaciones nulas en el gen *RGA*, como la mutación *rga-24*, suprimen parcialmente el fenotipo de los mutantes *gal-3*, en cuanto a la expansión foliar, tiempo de floración, elongación del tallo y dominancia apical<sup>(150)</sup>. La mutación nula *gai-t6*, por el contrario, tiene un efecto mucho menor sobre el fenotipo *gal-3*. Sin embargo, esta mutación en combinación con *rga-24* es capaz de suprimir prácticamente todos estos defectos, de manera que el triple mutante *gal-3/rga-24/gai-t6* presenta un fenotipo alargado casi idéntico al de las plantas silvestres<sup>(32, 98)</sup>. Estos resultados sugieren que las GAS regularían el crecimiento y desarrollo de la planta, al liberar la represión impuesta por las proteínas DELLA. De acuerdo con esta hipótesis, se ha demostrado que tanto las proteínas RGA como GAI fusionadas a la proteína fluorescente verde GFP presentan una localización nuclear en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, y que la fluorescencia debida a estas proteínas desaparece a la media hora de aplicar GAS<sup>(31, 149)</sup>.

Plantas transgénicas portadoras de las construcciones *rga-Δ17* o *rgII-Δ17*, con una delección similar a *gai-1*, muestran también un fenotipo enano insensible a GAs de carácter dominante (Fig. 7)<sup>(31, 168, 176)</sup>. Ello indicaría que dicha delección hace que estas proteínas presenten una actividad represora de carácter constitutivo, que no es inactivada por GAs. En efecto, se ha demostrado que mientras las GAs inducen una rápida degradación de las proteínas GAI y RGA silvestres, las proteínas *gai-1* o *rga-Δ17* no son degradadas en presencia de estas hormona<sup>(31, 149)</sup>.

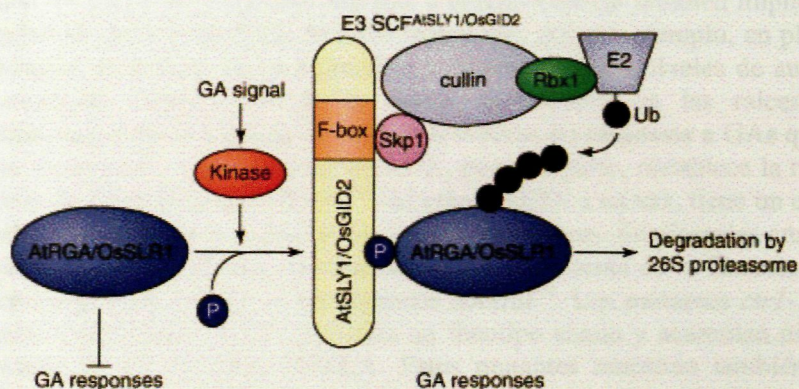
## **b. El complejo SCF<sup>SLY</sup> en la regulación de la señal de GAs.**

Los genes F-box *GA-INSENSITIVE DWARF2* (*OsGID2*) de arroz y *SLEEPY1* (*AtSLY1*) de *Arabidopsis* funcionan como reguladores positivos de la respuesta de GAs. Recientemente se ha demostrado que RGA y SRL1 son dianas directas de SLY1 y GID2, respectivamente. Los mutantes enanos *sly1* y *gid2* acumulan niveles muchos más altos de las proteínas RGA y SRL1 que las plantas silvestres<sup>(108, 145)</sup> y alelos nulos para *rga* suprimen parcialmente el fenotipo enano del mutante *sly1*. Ello demostraría que la acumulación de niveles elevados del represor RGA es el causante del fenotipo enano de estos mutantes y, por tanto, que RGA actuaría por debajo de SLY1 en la ruta de señalización de GAs<sup>(108, 159)</sup>. En ensayos de doble híbrido en levadura, se demostró que GID2 interacciona con el homólogo *OsSklp2* de arroz que codifica uno de los componentes del complejo SCF, lo que llevó a concluir que GID2 es parte de un complejo SCF<sup>(145)</sup>. Así, los complejos SCF<sup>SLY1</sup> y SCF<sup>GID2</sup> podrían ubiquitinar RGA y SRL1, respectivamente, marcando estas proteínas para su degradación por el sistema 26S proteasoma<sup>(159)</sup>. En estudios inmunoblot, utilizando un anticuerpo anti-Ub, se detectó una acumulación de formas poli-ubiquitinadas de SLR1 en extractos de plantas silvestres pre-tratadas con el inhibidor de proteasoma MG132, lo que demostraría que una cascada de ubiquitinación es en efecto responsable de señalar la degradación de estos represores<sup>(145)</sup> (Fig. 8).

El mecanismo mediante el cual las GAs promueven la degradación de las proteínas DELLA se desconocía hasta hace poco. Se postuló que las GAs podrían inducir la modificación de estos represores, favoreciendo así su interacción con el componente F-box del complejo SCF. En arroz, se ha demostrado que SLR1 es fosforilado en presencia de GAs<sup>(86)</sup> y que sólo la forma fosforilada de este represor es capaz de unirse a la proteína F-box GID2 *in vitro*<sup>(53)</sup>. En *Arabidopsis*, se han obtenido también evidencias similares, que indicarían que la proteína GAI fosforilada se une con mayor afinidad la proteína F-box SLY1<sup>(43)</sup>. Sin embargo, el aislamiento de la proteína receptora GID1 ha permitido demostrar que dicho receptor interacciona en presencia de GAs con el dominio DELLA de SLR1, induciendo un cambio de conformación en este represor. Este cambio conformacional promueve su unión a la proteína F-box GID2, señalizando así la ubiquitinación de SLR1 y su posterior degradación por el 26S proteasoma<sup>(170)</sup>.







**Figura 8.** Modelo de degradación de los represores DELLA en respuesta a GAs. Las GAs activan la fosforilación de las proteínas AtRGA/OsSLR1 lo que induce su degradación por el 26S proteasoma. Las proteínas fosforiladas son reclutadas al complejo E3 ligasa SCF<sup>AtSLY1/OsGID2</sup> por la subunidad F-box AtSLY/OsGID2. Las proteínas diana fosforiladas son así ubiquitinadas y finalmente degradadas por el sistema 26S proteasoma. La degradación de las proteínas AtRGA/OsSLR1 activa la respuesta a GAs. Adaptado de Itoh H. y col. *Trends in Plant Science* (2003).

#### 1.4.3.- Otras señales hormonales implicadas en la regulación de los represores DELLA.

Las proteínas DELLA, además de tener un papel principal en la regulación dependiente de GAs de la germinación, la elongación del tallo y la floración, ejercen también un papel regulador en algunos procesos mediados por otras hormonas. Así, estudios recientes han demostrado la importancia de estos represores en la respuesta de tolerancia al estrés salino, en la que la hormona ácido abscísico (ABA) juega un papel principal. Brotes de *Arabidopsis* crecidos en 100 mM de NaCl, acumulan niveles elevados de ABA y muestran una reducción en los niveles de GA<sub>1</sub> y GA<sub>4</sub>, la cuál se traduce en un aumento de la estabilidad de los represores DELLA, y en una inhibición del crecimiento. Se ha observado que 1 h de tratamiento con 50 mM NaCl es suficiente para inducir una clara estabilización de la proteína de fusión GFP-RGA<sup>(1)</sup> y que las raíces tratadas con ABA acumulan también niveles elevados de esta proteína de fusión. Dicha acumulación no ocurre en las líneas *abi1*, con una mutación en un gen serina/treonina fosfatasa necesario para la activación de la ruta de señalización de ABA<sup>(1)</sup>, lo que indica que es dependiente de esta vía de señalización. Los mutantes *gai-1*, por otra parte, son más resistentes a condiciones de estrés salino, mientras que los mutantes nulos DELLA son más susceptibles a estas condiciones, lo que indicaría que estos represores se acumulan como parte de un mecanismo de adaptación a las condiciones de estrés. Sin embargo, es posible que dicha estabilización sea tejido dependiente ó afecte sólo algunos de los miembros de la familia DELLA, ya que en células de aleurona de cebada la aplicación de ABA no afecta los niveles de acumulación del homólogo SLN1 de cebada<sup>(56)</sup>.

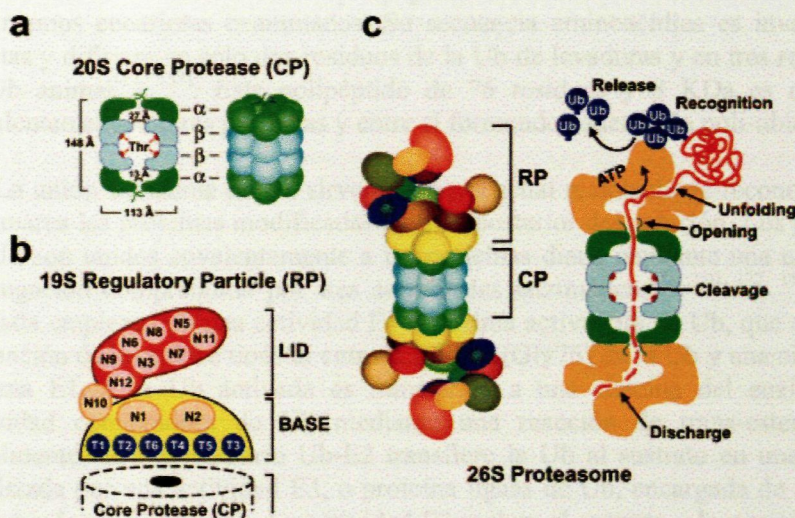


Además de ABA, las hormonas auxinas y etileno estarían también implicadas en la regulación de la estabilidad de estos represores. Así por ejemplo, en plantas de *Arabidopsis* en las que se ha inducido un descenso en los niveles de auxinas (AUX) mediante decapitación de la planta, se observa en las raíces una degradación menor de la proteína de fusión GFP-RGA en respuesta a GAs que en plantas no decapitadas. La aplicación de AUX, por otra parte, restablece la rápida degradación de la proteína GFP-RGA<sup>(41)</sup>. El etileno (ET), a su vez, tiene un efecto opuesto al de las AUX en la degradación de estos represores. En plántulas crecidas en presencia de ET, se observa una pérdida mucho más lenta de la fluorescencia de la proteína GFP-RGA que en las plántulas control<sup>(2)</sup>. Los mutantes *ctr1-1* con una respuesta constitutiva a ET, muestran un fenotipo enano y acumulan niveles más elevados de las proteínas DELLA. Estos mutantes muestran también una mayor supervivencia cuando son crecidos en medio con alta sal. Esta mayor tolerancia está al menos en parte mediada por los represores DELLA, ya que el triple mutante *ctr1-1/gai-16/rga-24* es mucho más susceptible a estrés salino que el mutante *ctr1-1*<sup>(1)</sup>. De que modo las hormonas AUX, ET ó ABA modulan la estabilidad de las proteínas DELLA, se desconoce por el momento. Sin embargo, está claro que estas diferentes vías de señalización convergen para controlar la estabilidad de las proteínas DELLA.

## 2.- EL PROTEASOMA 26S Y SUS COMPONENTES.

La síntesis de nuevas proteínas y la degradación controlada de proteínas pre-existentes, cuya función ya no es necesaria, son dos procesos fundamentales que regulan todos los aspectos de la vida de la planta. Mediante este “ciclo proteico”, se llegaría a reemplazar semanalmente cerca del 50% del total de proteínas de la célula<sup>(153)</sup>. El complejo 26S proteasoma junto con los lisosomas constituyen los dos principales sistemas proteolíticos de la célula eucariota<sup>(30)</sup>. El proteasoma es un complejo proteolítico dependiente de ATP, de cerca de 2 MDa, que degrada proteínas conjugadas con el polipéptido Ub (ubiquitina)<sup>(60, 153, 172)</sup>. Este complejo está formado por 31 subunidades agrupadas en dos subcomplejos principales, el núcleo proteolítico 20S (CP, por sus siglas en inglés) y la partícula reguladora 19S (RP, por sus siglas en inglés)<sup>(153, 172)</sup>. El módulo catalítico está constituido por múltiples anillos apilados, con los sitios activos dirigidos hacia su cara interna formando una cámara ó bolsillo hidrolítico. Dicha estructura está comprendida por 4 anillos formados por subunidades ordenadas  $\alpha\beta\beta\alpha$ , con las subunidades  $\alpha$  situadas en el exterior y las dos subunidades  $\beta$  que contienen el sitio activo situadas en el centro<sup>(30, 129, 153)</sup> (Fig. 9). Aunque la mayor parte de la información acerca de estos complejos deriva de estudios realizados en levaduras y mamíferos, estudios realizados en plantas, particularmente en *Arabidopsis* y arroz, indican que los complejos vegetales presentan un diseño semejante. Sin embargo, en vegetales, se han identificado diferentes isoformas del proteasoma 26S, lo cual sugiere que este sistema podría estar más desarrollado en plantas<sup>(153, 186)</sup>.





**Figura 9.** Organización y estructura del proteasoma 26S. **(a)** Organización del núcleo proteolítico 20S (CP) mostrando el ordenamiento de sus 4 subunidades. **(b)** Organización de la partícula reguladora 19S (RP), en base a los mapas de interacción de sus subunidades. La tapa y la base se representan en rojo y amarillo, respectivamente. **(c)** Diagrama combinado del proteasoma 26S mostrando el funcionamiento del complejo y la degradación de proteínas ubiquitinadas. Según Smalle, J. y Viestra, D. **Annual Review of Plant Biology** (2004).

Este sistema juega un papel importante en la gestión interna de la célula, al retirar las proteínas con un plegamiento defectuoso y proveer de aa libres durante las etapas de crecimiento y situaciones de inanición<sup>(172)</sup>. También interviene en prácticamente todos los procesos de regulación celular, ya que permite la rápida inactivación de rutas de señalización existentes, actuando como una delicada vía de homeostasis y permitiendo la adaptación a nuevos ambientes, así como una redirección del crecimiento y desarrollo<sup>(60, 153, 172)</sup>. Aunque durante mucho tiempo se pensó que este sistema actuaba sólo en el citosol y pudiera ser que en el núcleo, evidencias experimentales más recientes han demostrado que proteínas ancladas a la membrana ó incluso proteínas compartimentalizadas, implicadas en las rutas de secreción, pueden también ser degradadas por el sistema proteasoma<sup>(21)</sup>. Por tanto, no es de extrañar que esta ruta de degradación esté implicada en la regulación de gran número de procesos celulares básicos, tales como el ciclo de división celular, distintos procesos de diferenciación y desarrollo, la respuesta al estrés, la morfogénesis, la modulación de receptores celulares, canales iónicos y vías secretoras, la reparación del DNA, la apoptosis y la biogénesis de organelos, entre otros<sup>(21)</sup>.

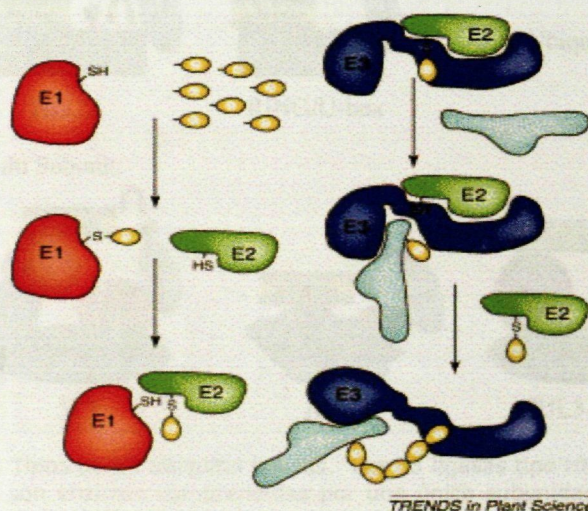
## 2.1.- DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL SISTEMA PROTEASOMA 26S.

La Ubiquitina (Ub) fue la primera proteína identificada capaz de modificar covalentemente otras proteínas. Aunque al principio se pensó que estaba implicada en marcar proteínas mal plegadas para su degradación por el proteasoma 26S, más recientemente se ha demostrado que la conjugación de Ub ó ubiquitinación, ejerce una función reguladora tan importante como la



fosforilación<sup>(128)</sup>. La Ub es un polipéptido altamente conservado en todos los organismos eucariotas examinados. Su secuencia aminoacídica es invariable en plantas y difiere en sólo dos residuos de la Ub de levaduras y en tres residuos de la Ub animal<sup>(17, 153)</sup>. Este polipéptido de 76 residuos y 8 KDa es conjugado covalentemente a otras proteínas y entre sí formando cadenas de poli-ubiquitina.

La unión covalente de Ub sirve como una señal reciclable de reconocimiento, que marca las proteínas modificadas para su posterior degradación. Los polímeros de Ub son unidos covalentemente a las proteínas diana mediante una cascada de conjugación comprendida por tres actividades enzimáticas<sup>(75, 110, 127, 153, 172)</sup>. La cascada empieza con una actividad E1 ó enzima activadora de Ub, que cataliza la formación de un enlace tioéster entre la glicina (Gly76) de la Ub y una cisteína del enzima E1. Esta Ub activada es transferida a una cisteína del enzima E2 o actividad conjugadora de Ub mediante una reacción de trans-esterificación. Finalmente, el intermediario Ub-E2 transfiere la Ub al sustrato en una reacción catalizada por una actividad E3, o proteína ligasa de Ub, encargada de reconocer la diana de ubiquitinación. La actividad E3 recluta el sustrato y lo posiciona cerca del intermediario Ub-E2, iniciándose así la transferencia de Ub<sup>(11, 49, 127)</sup>. El producto final es un conjugado Ub-proteína en el cual se forma una unión isopeptídica entre la Gly C-terminal de la Ub y uno o más grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos lisina (Lys) de la proteína diana<sup>(153, 172)</sup>. A la unión inicial de Ub siguen sucesivos eventos de conjugación que ensamblan una cadena múltiple de Ubs, utilizando los residuos Lys de la Ub como sitios de unión de Ubs adicionales<sup>(49, 93, 172)</sup> (Fig. 10).

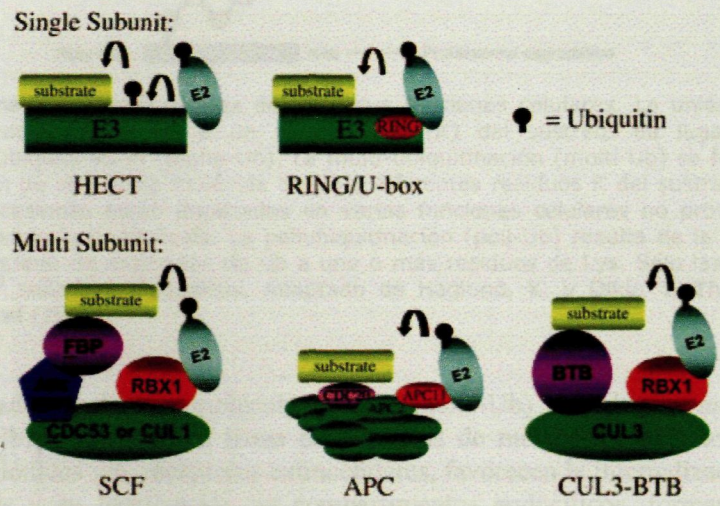


**Figura 10.** La Ubiquitina ((Ub) en amarillo) es activada por una enzima activadora de Ub, E1, (en rojo). La Gly C-terminal de la Ub forma un enlace tioéster con un residuo Cys de la E1. La Ub activada es transferida a uno de los enzimas de conjugación de Ub o E2 (en verde), a través de un enlace tioéster con un residuo Cys del enzima. La Ub es por último transferida al sustrato (en celeste), formando una unión isopeptídica con un residuo Lys interno del sustrato. La ubiquitinación del sustrato requiere una ubiquitin-protein ligasa o E3 (azul), la cual une la E2 y el sustrato. Las E3 ligasas del tipo SCF, U-box y RING-finger unen el sustrato y la E2 en una región proxima, en tanto que las E3 de tipo HECT forman un intermediario tioéster con la Ub antes de transferirla al sustrato. Ciclos sucesivos de adición de moléculas Ub, dan lugar a una cadena de poliubiquitina reconocida por el proteasoma 26S. Adaptado de Bachmair, A. y col. **Trends in Plant Science** (2001).



El sustrato así modificado es entonces reconocido por el sistema proteasoma 26S y progresivamente degradado en péptidos pequeños. Al inicio de este proceso, la Ub es separada por enzimas específicos de de-ubiquitinación y reutilizada en nuevos ciclos de modificación<sup>(49, 75, 127, 172)</sup>.

La ubiquitinación de proteínas conlleva implícito un reconocimiento preciso de los sustratos a ubiquitinar por parte de E3 ligasas específicas<sup>(49, 127)</sup>. La especificidad del proceso viene de hecho reflejada por la complejidad de las familias génicas de dichas actividades enzimáticas. En *Arabidopsis* por ejemplo, se han identificado 2 genes que codifican enzimas E1 y al menos 45 que codifican enzimas E2 o proteínas parecidas a E2. Sin embargo, se han identificado más de 1.300 genes que codifican putativas E3 ligasas<sup>(49, 127, 172)</sup>. En plantas se han descrito varios tipos de E3 ligasas, las cuales en base a su composición y mecanismo de acción se han dividido en HECT (*Homology to E6AP C-terminus*) E3 ligasas, RING (*Real Interesting New Gene*)/U-Box E3 ligasas, y E3 ligasas complejas tipo SCF (Skp1/CDC53/F-box, APC (*Anaphase-promoting complex*) y CUL3-BTB<sup>(110)</sup> (Fig. 11). Estas proteínas o complejos proteicos son las responsables de la selección del sustrato y de la transferencia de la Ub activada a los residuos lisina de la proteína diana<sup>(110, 126, 172)</sup>.

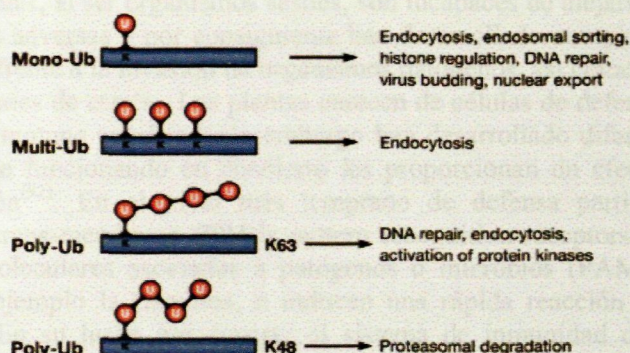


**Figura 11.** Tipos de E3 ubiquitin ligasas. Las E3 ligasas tipo HECT, RING-finger y U-box (arriba) son enzimas comprendidas por una única subunidad. Las E3 ligasas tipo SCF, APC ó CUL3-BTB, por el contrario, son complejos enzimáticos formados por múltiples subunidades. Adaptado de Moon, J. y col. **The Plant Cell** (2004).



## 2.2.- SEÑALIZACIÓN POR UBIQUITINACIÓN.

Aunque está bien establecido que la unión de cadenas poli-Ub unidas entre sí por el residuo lisina 48 (Ub<sup>Lys48</sup>) constituye una señal de degradación por el sistema proteasoma, más recientemente se ha visto que la unión de Ub puede también señalar otras funciones celulares. Así, se han identificado proteínas modificadas con un sólo péptido Ub (mono-Ub) ó con cadenas Ub<sup>Lys63</sup>, con una conformación mucho más extendida que las cadenas Ub<sup>Lys48</sup>. Estas modificaciones no señalizan degradación sino que están más relacionadas con el establecimiento de redes de interacción proteína-proteína y transporte intracelular<sup>(57)</sup> (Fig. 12). Por ejemplo, se ha establecido que varios receptores de membrana son ubiquitinados durante la estimulación con ligandos extracelulares y que dicha modificación determina la endocitosis del receptor<sup>(74)</sup>.



**Figura 12.** Modificaciones de Ub y sus funciones celulares. La unión de una sólo molécula de Ub a un residuo Lys (K) del sustrato da lugar a una monoubiquitinación (mono-Ub). La multi-ubiquitinación (multi-Ub) se forma por adición de una única molécula de Ub a diferentes residuos K del sustrato. Estas modificaciones están implicadas en varias funciones celulares no proteolíticas, incluyendo la endocitosis. La poliubiquitinación (poli-Ub) resulta de la unión de una cadena de moléculas de Ub a uno o más residuos de Lys. Sólo las cadenas Ub<sup>Lys48</sup> señalizan proteólisis. Adaptado de Haglund, K. y Dikic, I. **The EMBO Journal** (2005).

La adición de una molécula de Ub (mono-Ub) o múltiples moléculas Ub (multi-Ub) a los residuos lisina de proteínas de membrana tales como algunos canales iónicos y/o receptores extracelulares, favorecen la internalización de estas proteínas y su localización en compartimentos endocíticos, formando cuerpos multi-vesiculares o MVB<sup>(27, 57, 74)</sup>. El papel exacto de la ubiquitinación en los pasos tempranos de endocitosis es aún motivo de controversia. Si bien la Ub parece facilitar la formación de vesículas endocíticas, se ha visto también que es dispensable para la internalización de muchos receptores transmembrana<sup>(76)</sup>. El ejemplo mejor estudiado de internalización dependiente de ligando es el constituido por el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) en mamíferos (Anexo 3). En este caso, la internalización del receptor requiere una actividad E3 ubiquitin ligasa que une múltiples moléculas Ub (multi-Ub), las cuales señalizan su internalización<sup>(27)</sup>.

En plantas se ha reportado también recientemente la internalización de los receptores de brasinosteroides (BRI1)<sup>(70, 115, 175)</sup> y flagelina (FLS2)<sup>(50, 51)</sup>. Estudios con el receptor FLS2 han demostrado que una incubación con el inhibidor de

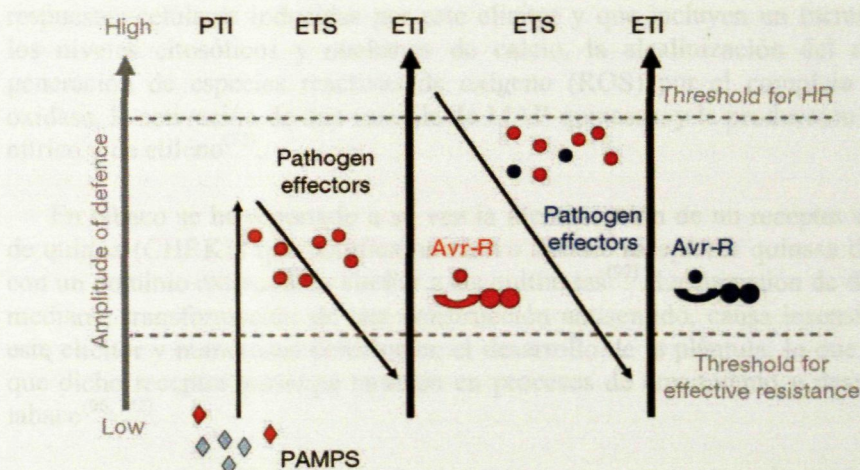


proteasoma MG132, inhibe su internalización aún en presencia del ligando, lo que sugiere que el sistema proteasoma podría tener un papel tanto en la propia endocitosis como en la posterior degradación del receptor<sup>(134, 135)</sup>. Estudios llevados a cabo con el receptor de quitina de tabaco CHRK1, por otra parte, han establecido que este receptor interacciona en ensayos doble híbrido en levadura con la proteína U-box/Arm repeat *NtPUB4*<sup>(96, 97)</sup>. Dicha proteína muestra un patrón de expresión similar al del receptor y en ensayos de expresión transitoria en epidermis de cebolla co-localiza con el receptor. Sin embargo, se desconoce aún la relevancia de dicha interacción en la percepción del elicitor, y su posible papel regulador de la respuesta de defensa frente a hongos patógenos<sup>(96)</sup>.

### 3.- SISTEMA INMUNE DE PLANTAS.

Las plantas, al ser organismos sésiles, son incapaces de alejarse de situaciones ambientales adversas y por consiguiente han desarrollado complejos mecanismos de defensa frente a la invasión de organismos patógenos, así como de adaptación a las condiciones de estrés. Las plantas carecen de células de defensa móviles y de un sistema inmune somático, sin embargo han desarrollado diferentes niveles de defensa, que funcionando en concierto les proporcionan un efectivo sistema de inmunización<sup>(92)</sup>. En el nivel más temprano de defensa participan diferentes receptores trans-membrana (PRR's pattern recognition receptors) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos ó microbios (PAMPs ó MAMPS) como por ejemplo la flagelina, e inducen una rápida reacción defensiva en la célula<sup>(191)</sup>. En su lucha por superar el sistema de inmunidad de la planta, los patógenos han desarrollado efectores específicos, generalmente péptidos ó proteínas, dirigidos a neutralizar estos intermediarios iniciales de defensa. Las plantas, por su parte, han evolucionado generando niveles adicionales de defensa que les permiten contrarrestar los efectos neutralizantes de estos efectores patogénicos. En este segundo nivel intracelular de defensa, participan las proteínas NB-LRR codificadas por los genes R de resistencia de la planta<sup>(28, 92)</sup>. Estas proteínas reconocen específicamente diversos efectores bacterianos, y al reconocerlos inducen una fuerte potenciación de la reacción de defensa inicial. Si la planta es capaz de contrarrestar el efector del patógeno, se inicia una ruta de defensa que promueve la activación de una respuesta hipersensible (HR, por sus siglas en inglés) que detiene el patógeno invasor. Además de esta reacción local e inmediata de defensa, se induce también una reacción de resistencia sistémica adquirida (SAR), que hace que la planta sea menos susceptible a posteriores ataques, ya sea por parte de hongos, bacterias y virus<sup>(34)</sup>. En este caso, el efector patogénico es denominado factor de avirulencia (Avr) y las proteínas de defensa de la planta proteínas R (de Resistencia). Por el contrario, si la planta es atacada por un patógeno con un particular factor Avr para el que la planta carece de los correspondientes genes R de reconocimiento, ésta será susceptible al ataque<sup>(34)</sup>. Esta intrincada red de reacciones de reconocimiento y defensa puede resumirse en el modelo en cuatro fases o modelo zig-zag propuesto por Jones *y col.* (Fig. 13)<sup>(92)</sup>.





**Figura 13.** Modelo zig-zag de inmunidad en plantas. En una primera fase, los PAMPS (o MAMPs) son reconocidos por los PRRs transmembrana, activando una inmunidad inducida por PAMPS (PTI, por sus siglas en inglés) capaz de inhibir futuras colonizaciones. En una segunda fase, aquellos patógenos exitosos, expresan efectores que contribuyen a la virulencia del patógeno al interferir con la respuesta PTI, lo que conlleva una susceptibilidad inducida por efectores o ETS. En una tercera fase, el efector es reconocido directa ó indirectamente por una de las proteínas NB-LRR, lo que activa una inmunidad inducida por el efector o ETI. La ETI es una respuesta PTI amplificada y más rápida, que da lugar a una resistencia al patógeno y normalmente una respuesta hipersensible (HR) con muerte celular en el sitio de infección. En la fase 4, una selección natural permitiría al patógeno evitar la ETI, ya sea por enmascaramiento o diversificación de los genes efectores reconocidos por la planta. Adaptado de Jones, J. D. J. y col. **Nature** (2006).

La habilidad para diferenciar lo propio de lo no-propio es crítico para la planta ya que le permite poner en funcionamiento una respuesta inmune efectiva contra potenciales patógenos invasores. Los PAMPs, también conocidos como elicitores de tipo general, son exclusivos de organismos patógenos y, por tanto, son la base de dicho reconocimiento<sup>(82)</sup>. El elicitador arquetipo de la respuesta PTI es la flagelina bacteriana<sup>(52)</sup>. La motilidad basada en el flagelo determina en muchos casos la patogenicidad de la bacteria siendo la flagelina el principal componente del filamento flagelar de eubacterias<sup>(191)</sup>. Los receptores de flagelina, junto al sistema EF-Tu, son los receptores de membrana en plantas mejor caracterizados<sup>(82, 101, 192)</sup>. El péptido sintético de 22 aa flg22, basado en el dominio N-terminal conservado de la flagelina, es capaz de inducir muchas de las respuestas celulares de defensa<sup>(38)</sup>, incluyendo una rápida (<1 h) inducción transcripcional de más de 1.100 genes en *Arabidopsis*<sup>(193)</sup>. Un rastreo genético de líneas incapaces de responder al péptido flg22, permitió la identificación del receptor FLS2 (*Flagellin Sensing2*), responsable de su percepción. FLS2 pertenece a una familia de receptores del tipo LRR-quinasa, semejante al receptor TLR5 de mamíferos, si bien ambos receptores reconocen dominios diferentes de la flagelina<sup>(191)</sup>. El receptor FLS2 se internaliza mediante un proceso de endocitosis tras su estimulación y se cree que dicha internalización es esencial para la función del receptor<sup>(134, 135)</sup>. Los mutantes *fls2*, por otra parte, son más sensibles a infecciones por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*DC3000) aunque este fenotipo se observa sólo cuando la bacteria se aplica mediante pulverización pero no cuando ésta se infiltra con una jeringa directamente en el apoplasto de la planta<sup>(193)</sup>. Dicho comportamiento estaría de acuerdo con una función del receptor en las fases tempranas de infección, aspecto que se pone también de manifiesto por las



respuestas celulares inducidas por este elicitador y que incluyen un incremento en los niveles citosólicos y nucleares de calcio, la alcalinización del medio, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por el complejo NADPH oxidasa, la activación de una cascada de MAP-quinasas, y la producción de óxido nítrico y de etileno<sup>(82)</sup>.

En tabaco se ha reportado a su vez la identificación de un receptor quinasa-1 de quitina (CHRK1) que codifica un nuevo tipo de receptores quinasa de plantas con un dominio extracelular similar a las quitinasas<sup>(97)</sup>. La supresión de dicho gen, mediante transformación de una construcción antisentido, causa insensibilidad a este elicitador y numerosos defectos en el desarrollo de la plántula, lo que indicaría que dicho receptor participa también en procesos de crecimiento y desarrollo en tabaco<sup>(96, 142)</sup>.

#### 4.- BALANCE HORMONAL DURANTE LA REACCIÓN DE DEFENSA.

En el siglo XIX, se observó que plantas de arroz infectadas con el hongo *Gibberella fujikuroi* mostraban un crecimiento excesivo debido a la presencia del hongo. Más tarde, el compuesto responsable de dicho fenotipo recibió el nombre de Giberelina (GA) en referencia al hongo productor. Otras infecciones por patógenos están también asociadas con una inhibición del crecimiento de la planta o con un crecimiento excesivo, indicativo de una alteración en los niveles de estas hormonas en los tejidos infectados. Sin embargo, existen muy pocos estudios que demuestren una función de las giberelinas en la interacción planta-patógeno, a diferencia de otras hormonas como el ácido salicílico (SA), el jasmonico (JA) ó el etileno (ET), cuya función señalizadora en la reacción de defensa ha sido extensamente estudiada y cuyo papel en resistencia está bien documentado en la actualidad. SA, JA, y ET tienen funciones diferentes en defensa<sup>(34, 58, 136, 190)</sup>. En tanto que el SA está asociado a resistencia a patógenos biótrofos, JA y ET están en general asociados con resistencia a hongos necrótrofos. Ambas vías de señalización interaccionan de manera antagónica y la inducción de una de ellas atenúa la otra<sup>(136)</sup>. Este antagonismo es explotado en algunos casos por el patógeno para favorecer la infección.

Típicamente, en respuesta a la infección por patógenos biótrofos se induce un incremento en los niveles de SA. Ello estimula una ruta de señalización a través de la proteína reguladora NPR1 (*non-expresser of PR genes*) que activa la expresión de numerosos genes relacionados con patogenicidad (PR). NPR1 se identificó en un rastreo de mutantes incapaces de responder a SA. El mutante *npr1* es incapaz de inducir la respuesta SAR (*systemic acquired resistance*) en respuesta a SA ó su análogo INA (ácido 2,6-dicloroisonicotínico) y es altamente susceptible a infecciones por *P. syringae* pv. *tomato* (*Pst*)<sup>(34)</sup>. Curiosamente, *Pst*DC3000 utiliza la interacción negativa entre la resistencia a biótrofos controlada por SA y la resistencia a necrótrofos controlada por JA/ET, en su propio favor. Dicha bacteria produce la fitotoxina coronatina (COR) que mimetiza muchos de los efectos del JA. De este modo suprime la señalización por SA y consigue escapar a la defensa natural de la planta. De acuerdo con dicho mecanismo de acción, las bacterias *Pst*DC3000 mutantes incapaces de producir coronatina (*cor*<sup>-</sup>) crecen en líneas mutantes *sid2* defectivas en la producción de SA igual que las bacterias silvestres



*Pst*DC3000. Por su parte, los mutantes *coi1* con un bloqueo en la ruta de señalización de JA son más resistentes a la infección por *Pst*DC3000<sup>(105)</sup>.

Recientemente, se demostró que las auxinas ejercen también un papel inhibitorio en la reacción de defensa frente a biotrófos. La aplicación de flagelina reprime una serie de genes de respuesta temprana a auxinas<sup>(117)</sup> y estudios recientes han demostrado que la unión de flg22 al receptor FLS2 activa la expresión de un microRNA (*miR393*), que actúa como un regulador negativo de la ruta de señalización de auxinas. En estos estudios se demostró a su vez que la activación de la ruta de señalización de las auxinas como consecuencia de una sobre-expresión del receptor soluble de auxinas TIR1, aumenta la susceptibilidad de la planta a *Pst*DC3000 y que, por el contrario, una inhibición de la ruta de auxinas por sobre-expresión del microRNA *miR393*, induce una mayor resistencia a esta bacteria<sup>(116)</sup>. Estos resultados indicarían que la inhibición de la vía de señalización de auxinas forma parte de la respuesta inmune inducida en la planta y podría jugar un papel en la reacción de defensa. A este respecto, el hecho que en respuesta a patógenos biotrófos se induzcan los genes de biosíntesis de auxinas podría ser indicativo de una función represora de las auxinas sobre la ruta del SA, posiblemente a través de una activación de la ruta de señalización del JA<sup>(112)</sup>.

Curiosamente, en estudios en los que se analizó el perfil transcriptómico de plantas de *Arabidopsis* tratadas con flg22, se observó un incremento de hasta 6 veces en los niveles de expresión de dos genes GA 2-oxidasa (*At1g30040* y *At1g02400*), implicados en el catabolismo de GAs bioactivas. Dicha inducción no se observa en los mutantes *fls2-17* (con una mutación puntual en el dominio quinasa del receptor FLS2) lo que indicaría que la señalización a través del receptor FLS2 es necesaria para la activación de estos genes<sup>(193)</sup>. Las GAs, sin embargo, parecen ejercer un efecto opuesto a las auxinas en defensa, ya que promoverían la resistencia a patógenos biotrófos.

Las GAs promueven el crecimiento de la planta, al inducir la degradación de las proteínas represoras DELLA, que actúan como reguladores negativos de la respuesta a estas hormonas<sup>(25, 159, 164)</sup>. Estas hormonas ejercerían un efecto opuesto al de las auxinas en defensa, ya que parecen promover la resistencia a patógenos biotrófos. Así, estudios recientes han demostrado que mutantes nulos en los cinco genes DELLA son más resistentes a la infección por la bacteria *Pst*DC3000, debido a que muestran una potenciación de la ruta del SA (Navarro y col., resultados no publicados). Estos mutantes, por otra parte, son hipersensibles al patógeno necrótrofo *A. brassicicola*. Ello sugeriría que las DELLAs promueven la resistencia a necrótrofos y la susceptibilidad a biotrófos, en parte mediante la modulación del balance entre las vías de señalización de defensa mediadas por SA y JA/ET<sup>(136)</sup>.

## **5.- E3 LIGASAS COMO COMPONENTES ESPECÍFICOS EN LA DEFENSA DE PLANTAS.**

La importancia del sistema ubiquitin-proteasoma en la señalización de defensa se demostró al observar que mutantes afectados en diferentes componentes de este sistema proteolítico muestran una respuesta de defensa alterada a diferentes tipos de estrés biótico, producido ya sea por patógenos específicos o inespecíficos (*non-host*)<sup>(34)</sup>. La búsqueda de genes implicados en la reacción de defensa a patógenos

ha permitido identificar numerosas E3 ligasas, cuyos niveles de mRNA se ven fuertemente incrementados en respuesta a elicitores generales y factores de avirulencia<sup>(34, 188)</sup>. Así por ejemplo, en plantas de tabaco transformadas con el gen de resistencia *Cf9* frente a *Cladosporium fulvum* e inoculadas con el elicitor *Avr9* de este hongo, se identificó la proteína F-box *ACRE189* que muestra una fuerte inducción en respuesta a este elicitor<sup>(38)</sup>. El silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) del gen *ACRE189* reprime la capacidad de generar una HR mediada por *Cf4* y *Cf9* en las hojas silenciadas<sup>(139)</sup>, lo que indicaría que los complejos SCF<sup>COI1</sup> y SCF<sup>EBF1/EBF2</sup> no serían los únicos complejos SCF implicados en defensa.

Otras F-box también reguladas durante la reacción de defensa a patógenos son las correspondientes a los genes *TIR1*, *AFB2* y *AFB3*, con una función en la señalización de auxinas. La regulación de estos genes ocurre vía inducción del microRNA *mi392a*, cuya expresión es activada por el elicitor flagelina en infecciones por *P. syringae*<sup>(34, 116)</sup>. La acumulación del microRNA *mi392a* promueve el corte de los transcritos de *TIR1*, *AFB2* y *AFB3*, causando una disminución en los niveles de expresión de estas proteínas F-box, implicadas en la percepción de auxinas<sup>(34)</sup>. La ruta de señalización de auxinas se afectaría también durante la reacción de defensa a TMV (*Tobacco Mosaic Virus*). En ensayos de interacción en levaduras se observó que sólo los represores IAA26 e IAA27, pero no otros miembros de la familia Aux/IAA, interaccionan con la proteína replicasa de TMV. En tanto que el virus silvestre es capaz de inducir una sintomatología clara en plantas de *Arabidopsis* del ecotipo *Shahdara*, infecciones con el virus mutante TMV-V<sup>1087</sup>I causan un fenotipo mucho menos severo, lo que indicaría que dicha mutación afecta el sitio de interacción con los factores IAA. En estudios en que se co-infiltró el virus junto a la proteína de fusión IAA26-GFP, por otra parte, se observó fluorescencia sólo en un porcentaje muy reducido de células, lo que indicaría que TMV es capaz de desestabilizar IAA26, estimulando así la vía de señalización de auxinas. Resultados adicionales obtenidos en otros laboratorios, muestran también que como consecuencia de la interacción con la replicasa de TMV, las proteínas fluorescentes IAA26-GFP e IAA27-GFP se re-localizarían en el citosol, comprometiéndose así su función reguladora en el núcleo<sup>(34)</sup>.

A su vez, aunque se han identificado numerosos genes que codifican proteínas con un dominio RING en plantas, sólo un pequeño grupo de estos genes muestra una activación en condiciones de estrés biótico. Los niveles de mRNA correspondiente a los genes *ATL2* y *ATL6*, por ejemplo, aumentan rápidamente en *Arabidopsis* en respuesta al elicitor quitina, asociado a la pared celular de hongos y al exoesqueleto de insectos. Estos genes codifican dos E3 ligasas mono-peptídicas tipo RING<sup>(34)</sup>.

Resultados recientes han revelado también un papel importante de las proteínas U-box/ARM *repeat* en la defensa de plantas<sup>(142)</sup>. Esta familia de proteínas, con la combinación de un dominio U-box (E3 ligasa mono-peptídica) y repeticiones de dominios armadillo, es específica de plantas<sup>(111)</sup>. En *Arabidopsis* se han identificado 41 genes con estos dos dominios<sup>(111)</sup>.

En células de tabaco transformadas con el gen de resistencia *Cf9* de tomate (responsable de la resistencia a *C. fulvum*) se identificó la proteína U-box/ARM repeat ACRE276 por ser fuertemente inducida tras un tratamiento con el factor de avirulencia Avr9. El tratamiento con Avr9 induce en estas células una rápida respuesta hipersensible (HR) y muerte celular. El mecanismo que subyace es el reconocimiento de Avr9 por la proteína R Cf9, lo cual dispara la muerte de las células en contacto con Avr9 como mecanismo de defensa frente al patógeno invasor. Esta inducción podría pues ser indicativa de un papel de ACRE276 en la regulación de la HR. En efecto, ACRE276 resulta necesaria para la activación de la respuesta hipersensible, ya que las plantas silenciadas para este gen mostraron una atenuación de la HR tras el tratamiento con Avr9 y mayor susceptibilidad a *C. fulvum*<sup>(34)</sup>. Su ortólogo en *Arabidopsis*, PUB17, también regula positivamente la HR inducida por el reconocimiento de factores de avirulencia por las proteínas R RPM1 y RPM4. La actividad E3 ligasa de ambas proteínas ha sido demostrada *in vitro*<sup>(34)</sup>.

El gen *SPOTTED LEAF11* (*SPL11*) de arroz, que también codifica una U-box/ARM repeat, se induce fuertemente en respuesta a la inoculación con *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, tanto en cultivares de arroz resistentes como susceptibles, lo que es indicativo de una función de esta proteína en la defensa basal. En ensayos *in vitro* se ha demostrado la actividad E3 ligasa de la proteína. Los mutantes *spl11*, por otra parte, muestran un fenotipo caracterizado por la aparición de lesiones espontáneas, indicativo de una función de SPL11 en la degradación de reguladores positivos de la HR y muerte celular programada<sup>(34, 188)</sup>.

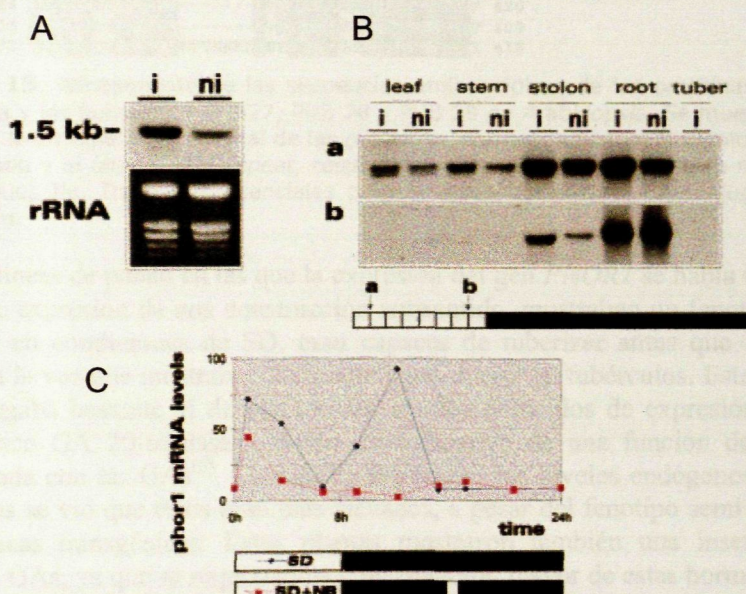
En perejil (*Petroselinum crispum*) se describió el péptido elicitor fúngico Pep25, el cuál induce una rápida activación del gen *PcCMPG1/ELI17* (Cys-Met-Pro-Gly1/Elicitor-induced17), correspondiente a una proteína U-box/ARM repeat. Una fusión del promotor de este gen al gen reportero GUS, muestra una fuerte activación en *Arabidopsis* en respuesta a elicitors fúngicos y bacterianos y a herida<sup>(34)</sup>. Los genes homólogos de *Arabidopsis*, *AtCMPG1/PUB20* y *PUB21*, muestran también una rápida activación en respuesta a un elicitor patógeno fúngico y a la infección por *P. syringae*. Estudios con los genes ortólogos de tabaco (*NtCMPG1/ACRE74*) y de tomate (*SlCMPG1*) han confirmado que estos genes están transcripcionalmente activados en respuesta a patógenos, y se ha demostrado que *NtCMPG1* tiene actividad E3 ligasa *in vivo*<sup>(34)</sup>. Al igual que PUB17 y a la inversa de SPL11, la proteína CMPG1 es un regulador positivo de la reacción HR, ya que plantas de tabaco y tomate con niveles reducidos de expresión de CMPG1 muestran una menor reacción HR tras el tratamiento con elicitors y con Avr9<sup>(54)</sup>.

Otros dos genes U-box/ARM repeat de *Arabidopsis*, PUB5 y PUB12, se han identificado como inducidos por el elicitor flg22<sup>(117)</sup>. Aparte de los ya mencionados, una búsqueda en Genevestigator nos ha permitido identificar al menos otros tres genes de la familia (PUB22, 23 y 24) inducidos por elicitors y por infección con *Pseudomonas syringae*. En resumen, la familia U-box/ARM repeat específica de plantas se perfila como una familia de proteínas involucrada en la defensa frente a patógenos.



## 6.- PHOR1.

La proteína PHOR1 se identificó en un estudio en el que se compararon los patrones de mRNA de hojas de plantas de patata *Solanum demissum* crecidas bajo condiciones inductoras (día corto o SD) o no inductoras (día corto con interrupción de la noche, SD+NB) de la tuberización (Fig. 14). *PHOR1* muestra expresión en todos los tejidos estudiados a excepción del tubérculo. Sin embargo, los niveles de este mensajero son más elevados en las hojas de plantas crecidas en SD y muestra un patrón diurno de expresión<sup>(5)</sup> (Fig. 14). *PHOR1* codifica una proteína de 46 KDa con un dominio C-terminal ARM repeat, el cuál comparte cierta similitud con la proteína  $\beta$ -catenina de vertebrados y armadillo de *Drosophila*, implicada en la transducción de señal de *wingless*<sup>(5)</sup> y el cuál parece mediar la interacción con otras proteínas. *PHOR1* presenta además un dominio U-box en su extremo N-terminal, el cuál se ha demostrado más recientemente que es común a un grupo de enzimas monoméricos con actividad E3 ligasa<sup>(10, 61)</sup>.



**Figura 14.** Perfil de expresión del gen *PHOR1* de patata. (A) Expresión del transcrito *PHOR1* en hojas de plantas de patata crecidas en condiciones inductoras y no-inductoras de la tuberización (B) Expresión tejido-específica del mRNA *PHOR1* y cambios en los niveles de expresión durante el día. En (a) las muestras fueron recogidas 1 h después del inicio del día, mientras que en (b) las muestras fueron recogidas 1,5 h antes del inicio de la noche. (C) Cambios en los niveles de mRNA de *PHOR1* en hojas plantas de patata inducidas (SD) y no inducidas (SD + NB) para tuberizar. El mRNA se acumula durante el día y en plantas crecidas en SD muestra un pico de expresión durante la primera mitad de la noche. Adaptado de Amador, V. y col. *Cell* (2001).



La relevancia funcional de estas proteínas en plantas viene reflejada por el elevado número de proteínas U-box independientes (más de 40) identificadas por ejemplo en *Arabidopsis*<sup>(10, 111)</sup>. La comparación de la proteína PHOR1 de patata con los distintos miembros de la familia U-box/ARM repeat de *Arabidopsis* permitió identificar 3 posibles ortólogos en esta especie modelo, i.e. PUB 27, PUB 28 Y PUB29 (Fig.15).

### U-box

```

PUB29 11 TVPSFFKCPISLDVMSPVSLCTGVTYDRSIQRWLD-GGNNTCPATMQLK KDFVFNLTLLRLINIWS 79
PUB27 9 TVPFFRCPIISLDVMKSPVSLCTGVTYDRASIQRWLD-GGNNTCPATMQLLONKDFIPNLTLLRLINIWS 77
PUB28 10 TVPCEFKCPISLDVMKSPVSLSTGVTYDRSIQRWLD-DGNNTCPATMQLLONKDFVFNLTLLRLIDEWS 78
PHOR1 12 TVPSTFRCPISLDVMKSPVSLCTGVTYDRSSIQWNL-GGNNTCPATMQLLPTDFIPNLTLLRLINWI 80
ARC1 279 TVPKDFICSISLNDPVIISTGQTYDRSIARWTHQEGRETCPKTCGRVLDLSEVSNLALR-LL-LWC 348
PUB14 247 VIEEYFRCPISLTLMKDEVIVSTGQTYDRSSIQWNL-AGHRTCPKSOETLHAGLTENYVLSLALWC 315
          *                               *                               *

```

### C-terminal

```

PUB29 382 AVVROMARDLIKVI-----KVNS-SALAAAYETKTTTHIMPF 415
PUB27 386 EAVRRMLDILLKVE-----KVNS-SCLSAVDKTTTHIMPF 420
PUB28 375 LAVRRMLDILLKVE-----KVNS-SCLSVYETKTTTHIMPF 409
PHOR1 377 EAVROMCGELVKALRVVNNKFNYS-SCLASVDKTTTHIMEY 418

```

**Figura 15.** Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las proteínas PHOR1 de patata y los homólogos PUB27, PUB 28 y PUB 29 de *Arabidopsis*. Se muestran las regiones N-terminal y C-terminal de las proteínas, correspondientes al dominio U-box conservado y el último ARM repeat, respectivamente. Con un asterisco se muestran los residuos Ile, Trp y Pro, esenciales para la unión del enzima E2 conjugador de ubiquitina.

Las líneas de patata en las que la expresión del gen *PHOR1* se había reprimido mediante expresión de una construcción antisentido, mostraban un fenotipo semi-enano y en condiciones de SD, eran capaces de tuberizar antes que las líneas control a la vez que mostraban un rendimiento mayor en tubérculos. Este fenotipo se asemejaba bastante al de plantas con niveles reducidos de expresión del gen biosintético GA 20-oxidasa y podía ser indicativo de una función de PHOR1 relacionada con las GAs<sup>(5)</sup>. Cuando se analizaron los niveles endógenos de estas hormonas se vio que éstos eran más elevados, a pesar del fenotipo semi-enano de estas líneas transgénicas. Estas plantas mostraron también una insensibilidad parcial a GAs, ya que se requería una concentración mayor de estas hormonas para inducir una elongación del tallo similar al observado en las plantas control. Las líneas que sobre-expresaban PHOR1, por el contrario, mostraban una longitud de los entrenudos del tallo ligeramente mayor que las plantas control y una mayor respuesta a bajas concentraciones de estas hormonas, además de una mayor resistencia a la aplicación del inhibidor de la síntesis de GAs, paclobutrazol<sup>(5)</sup>.

Resultados adicionales que indicaban una función de PHOR1 en la ruta de señalización de GAs, se obtuvieron también al analizar los niveles de expresión de los mensajeros GA 20-oxidasa y GA 2-oxidasa en las plantas PHOR1 antisentido. Estas líneas mostraban niveles más elevados del mensajero *GA20ox1* y niveles reducidos de *GA2ox*, lo que indicaba que la regulación por retroalimentación de estos genes estaba alterada en estas plantas (Fig. 16).

Finalmente, en estudios encaminados a determinar la localización subcelular de la proteína PHOR1 se generó una fusión a GFP, la cual se expresó de manera estable en células BY2 de tabaco. Estas células mostraron una localización citosólica de la proteína, así como una migración de la proteína al núcleo en respuesta a la aplicación de GAs. Dicha migración podía

observarse tras 4 h del tratamiento con GAs, pero después de 12 h la señal GFP se encontraba de nuevo distribuida en el citosol. Estos resultados parecían corroborar una función de la proteína PHOR1 en la señalización de GAs y, dado que posteriormente se demostró que las proteínas U-box corresponden a enzimas E3 ligasas, nos planteamos investigar en este trabajo si PHOR1 participa en una ruta alternativa de degradación de las proteínas represoras DELLA y cuál sería la función biológica de esta ruta alternativa.



**Figura 16.** Efectos de la inhibición de la expresión del gen PHOR1 mediante silenciamiento génico. En las líneas antisentido (8A3 y 8A29) se observa una clara disminución de la longitud del tallo de las plantas. El análisis de los niveles de expresión de los mensajeros correspondientes a enzimas involucrados en la síntesis y catabolismo de GAs (*GA20ox* y *GA2ox* respectivamente) demuestra que en estas líneas se encuentra alterada la regulación por retroalimentación de estos genes. Adaptado de Amador V. y col. **Cell** (2001).

## ***OBJETIVOS.***



## OBJETIVOS.

En el presente trabajo nos propusimos caracterizar la función molecular de PHOR1 en la ruta de señalización de GAs, determinar si PHOR1 es capaz de ubiquitinar los represores DELLA y señalar su degradación y en su caso estudiar la función de esta ruta alternativa de degradación al complejo SCF<sup>SLY</sup>. Dado que la ruta de señalización de GAs está mucho mejor caracterizada en *Arabidopsis* y que en esta especie modelo existen numerosas herramientas genéticas de las que no disponemos en patata, nos planteamos realizar dichos estudios en *Arabidopsis*.

El análisis de los patrones de expresión de los ortólogos de PHOR1 en *Arabidopsis* en las bases de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) y genevestigator (<https://www.genevestigator.ethz.ch/>) mostró que éstos son fuertemente inducidos en respuesta a elicitores patogénicos como la flagelina ó la quitina y en la infección con *Pseudomonas syringae*<sup>(193)</sup>.

Aunque hasta la fecha no se ha considerado que las GAs tengan un papel principal en defensa similar al de las hormonas ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) ó etileno (ET), resultados más recientes sí que implicarían a los represores DELLA en la modulación de las respuestas de defensa. Asimismo, se ha demostrado que el sistema Ub-proteasoma, y un número elevado de proteínas U-box/ARM *repeat* vegetales tienen una función determinante en la resistencia ó susceptibilidad de la planta a diferentes patógenos, participando tanto en las rutas de defensa basal, como en las vías específicas de defensa mediada por los genes de resistencia R. Con estos antecedentes nos planteamos pues los siguientes objetivos para este trabajo:

### 1.- OBJETIVOS GENERALES.

- Conservación de la función de la proteína PHOR1 en *Arabidopsis*.
- Implicación de la proteína PHOR1 en tráfico intracelular.
- Relación de la proteína PHOR1 con la vía de señalización de GAs.
- PHOR1 como integrador de la vía de señalización de GAs y el sistema de defensa de las plantas.

### 2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Conservación de la función de la proteína PHOR1 en *Arabidopsis*.
  1. Identificar los ortólogos de PHOR1 en *Arabidopsis*.
  2. Caracterización de la localización sub-celular de la proteína PHOR1.
- Implicación de la proteína PHOR1 en tráfico intracelular.
  1. Co-localización de PHOR1 con marcadores de endocitosis y tráfico intracelular.
  2. Fraccionamiento subcelular mediante centrifugación en gradiente lineal de sacarosa.

- **Relación de la proteína PHOR1 con la vía de señalización de GAs.**
  1. Expresión y purificación de la proteína recombinante PHOR1-St y sus ortólogos de *Arabidopsis* (PUB27/28/29) y de proteínas clave en la ruta de señalización de GAs (DELLA: GAI/RGA, SLY1).
  2. Ensayos de interacción proteína-proteína *in vitro* (*pull-down*).
  3. Identificación de los dominios de las proteínas DELLA implicados en la interacción con PHOR1.
  4. Ensayos de interacción *in vivo*.
  5. Ensayos de la actividad E3 ligasa de PHOR1 y de degradación *in vitro* de las proteínas DELLA.
  6. Estudio de la capacidad de PHOR1 de unir GAs.
  7. Producción de un anticuerpo policlonal anti-DELLA.
  8. Análisis de los fenotipos de sobre-expresión de PHOR1 en *Arabidopsis*.
  9. Complementación de la mutación *sly1-10* por la sobre-expresión de PHOR1.
- **PHOR1 como integrador de la vía de señalización de GAs y el sistema de defensa de las plantas.**
  1. Confirmar la inducción de los ortólogos PUB27/28/29 en respuesta a flagelina (flg22).
  2. Analizar la respuesta a flg22 de líneas mutantes en los genes represores DELLA y en líneas de sobre-expresión de SLY1 y PHOR1.
  3. Susceptibilidad a infecciones por patógenos biótros y necrótrofos de líneas PHOR1-OE, SLY-OE y DELLA-ko.

## ***MATERIALES Y MÉTODOS.***

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### 1.- MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS.

Las líneas de sobre-expresión de la proteína PHOR1 (PHOR1-OE) se generaron en plantas de *Arabidopsis* de los ecotipos *Landsberg erecta* (*Ler*) y *Columbia 0* (*Col-0*), mientras que las líneas de sobre-expresión de PHOR1-GFP y GFP-RGL3 se generaron sólo en el ecotipo *Ler*. Las líneas de sobre-expresión de *StSLY1* se generaron en el ecotipo *Col-0*. El quintuple mutante DELLA o *global* (*rga-24/gai-t6/rgl1-1/rgl2-1/rgl3-1*); el mutante cuádruple DELLA o *tetra* (*gai-t6/rga-t2/rgl1-1/rgl2-1*) y el mutante simple *rgl3-3* fueron donados por el Dr. Xing Wang Deng y se encuentran, los dos primeros en el ecotipo *Ler* y el último en *Col-0*. Los mutantes *gal-3* y *sly1-10* han sido previamente descritos por Sun y col., 1992<sup>(158)</sup> y McGinnis y col., 2003<sup>(108)</sup> y se encuentran en *Ler*. Las plantas PHOR1 x *sly1-10* se generaron por el cruce de los mutantes *sly1-10* y las líneas PHOR1-OE (*Ler*).

Para los experimentos de germinación y los tratamientos con inhibidores y hormonas, las plantas se crecieron en placa, mientras que para los experimentos de reversión de los fenotipos y para las infecciones con patógenos, las plantas se crecieron en el invernadero y se transfirieron a cámaras de cultivo especiales, tras la infección con patógenos o mantenidas en el invernadero para el caso de la reversión de los fenotipos. En todos los casos, el fotoperiodo fue de 16 h de luz y 8 de oscuridad.

Para el crecimiento de plantas *in vitro*, las semillas se esterilizaron en etanol al 70%, suplementado con 0,1% de SDS durante 15 min, se lavaron dos veces con etanol al 100% y secaron en la campana estéril. Las semillas se sembraron en placas con medio Murashige y Skoog (Duchefa Biochemie BV, Netherlands) suplementado con 1% de sacarosa y 0,55% de plant agar (Duchefa) (medio de germinación, MS1X). Las semillas se estratificaron 2 días a 4°C, antes de transferir las placas a la cámara de cultivo.

Para los experimentos de germinación, se emplearon semillas habían sido recogidas el mismo día, entre 1-3 meses antes de ser utilizadas. Las semillas se sembraron por triplicado (80-100 semillas por placa) en medio MS1X con concentraciones crecientes de PAC (Duchefa Biochemie BV, Netherlands) o GA<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI). Las soluciones stock (1000x) de GA<sub>3</sub> y PAC se disolvieron en etanol y se adicionaron al medio después de dejarlo atemperar a 50°C. Todos los experimentos de germinación se repitieron tres veces con resultados similares.

El péptido flg22 (NH<sub>2</sub>-QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA-COOH) fue sintetizado por Bio-Synthesis Inc. (Lewisville, Texas). Se disolvió en H<sub>2</sub>O a una concentración 10 mM y se añadió a una dilución 1:1000 al medio para la obtener una concentración final de 10 µM en las placas<sup>(135)</sup>.



El ácido jasmónico (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI) se disolvió en etanol a una concentración de 100 mM y se añadió a una dilución 1:10.000 a las placas (concentración final 10  $\mu$ M).

Para los experimentos de crecimiento de raíz, las semillas se germinaron en medio MS1X (24-48 h, hasta la emergencia de la radícula), se transfirieron a placas dMS1X (medio MS1X suplementado con 1,1% plant agar) con los respectivos tratamientos y se crecieron en posición vertical. Tras cuatro días se midió la longitud de las raíces con el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

## 2.- GENERACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS.

Para obtener la construcción *PHOR1*-pBinAR, la región codificante de *PHOR1* se liberó mediante digestión con los enzimas *Bam*HI/*Xho*I a partir de una construcción en pBluescript, y se insertó en el vector binario pBinAR previamente digerido con los enzimas *Bam*HI/*Sal*I. La construcción *PHOR1*-GFP que expresa la proteína de fusión *PHOR1*-GFP bajo control del promotor 2x35S, ha sido previamente descrita por Amador y col., 2001<sup>(5)</sup>.

El gen homólogo *SrSLY1* de patata (comparte un 55% de identidad y 66% de homología a nivel de aa con el gen de *Arabidopsis*) se identificó mediante búsqueda en la base de datos TIGR de patata. La pauta abierta de lectura (ORF) correspondiente a este gen se amplificó a partir de un cDNA de patata utilizando los cebadores SLY5: 5'-GAATTCATGAAGCGGCAATTCGACGCCGGA-3' y SLY3: 5'-CTCGAGTACAGTAAACCCAAACCTTAAGC-3', que introducen sitios de restricción *Eco*RI y *Xho*I en cada extremo (subrayado). El producto de PCR se clonó en el vector pTZ57R-T (Fermentas Inc., Hanover, MD) y se liberó de este vector mediante digestión con *Bam*HI/*Xba*I, para ser insertado en el vector pBinAR cortado con los mismos enzimas.

Para obtener la construcción *RGL3*-pK7WGF2.0 se amplificó la ORF correspondiente al gen *RGL3* a partir de un DNA genómico (el gen no presenta intrones), utilizando los cebadores *Rgl3*GFP-f: 5'-CACCCCCC TAATGAAACGAAGCCATCAAGAAAC-3' y *Rgl3*GFP-r: 5'-CTTTATGACG ACGTATCTACC-3'. El producto de PCR se clonó en el vector direccional de TOPO pENTR/D (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transfirió mediante la tecnología de Gateway al vector binario de expresión en plantas pK7WGF2,0 (Plant Systems Biology).

Estas construcciones se introdujeron en la cepa pGV3101 de *A. tumefaciens* y se utilizaron para transformar plantas de *Arabidopsis* (*Col*, *Ler* y *gal-3*) mediante infiltración de los órganos florales<sup>(22)</sup>. Las plantas transgénicas se seleccionaron en medio con kanamicina (30 mg/L) y se transfirieron a tierra, seleccionándose las líneas que presentaban niveles elevados de expresión del transgén mediante northern blot (*PHOR1*-OE, *SrSLY1*-OE) o detección de la epifluorescencia de la fusión *PHOR1*-GFP.

### 3.- EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.

Las proteínas recombinantes *SrPHOR1*, *BnARC1*, *SrSLY1* y los *AtPUB* se expresaron en *E. coli* y purificaron como fusiones a Strep-tag ó a la proteína GST.

Para la fusión de PHOR1 a Strep se usaron los cebadores complementarios: Strep-sense: 5'-CCATGGGATGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAAG-3' y Strep-antisense: 5'-GGATCCCTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCATCC-3', que tras ser anillado codifica para el péptido Strep-tag (WSHPQFEK, región en cursiva) y deja extremos cohesivos *NcoI* y *BamHI*. El cebador anillado se introdujo en el plásmido PHOR1-pUC19<sup>(5)</sup> digerido con *BspHI* y *BamHI* para fusionarlo en fase con la secuencia codificadora de PHOR1. La fusión PHOR1-Strep se amplificó con los cebadores pRSETbPHOR1-F: 5'-CGGGATCCAATGGTGAGAAATAGGAG-3' y pRSETbPHOR1-R: 5'-CCCAAGCTTACTATTTTTCGAACTGCGGG, que introducen sitios de restricción *BamHI* y *HindIII* en ambos extremos (se muestran subrayados) y se insertó como un fragmento *BamHI/HindIII* en el plásmido pRSETb (Invitrogen, Carlsbad, CA), para crear la construcción PHOR1-Strep/pRSETb.

La secuencia codificante de *ARC1* se amplificó a partir de una primera cadena de cDNA de *Brassica* usando los cebadores ARC1-5: 5'-CATGGAATTCATGGCCACTGATTCAGCAATG-3' y ARC1-3: 5'-TACGGTTCGACTTATCTCTGTGTGTTCTGGTC-3'. El fragmento obtenido por PCR se digirió con *EcoRI/SalI* (las dianas se muestran subrayadas en los cebadores) y se clonó en pZEX<sup>(154)</sup> digerido con *EcoRI/XhoI*.

Para obtener la construcción *SrSLY1*-pZEX, la ORF *SrSLY* se liberó de la construcción *SrSLY1*-pTZ57R-T (ver germinación de plantas transgénicas) mediante digestión *EcoRI/XhoI* y se clonó en el vector pZEX, digerido con los mismos enzimas.

Los ortólogos de PHOR1 *PUB27*, *PUB28* y *PUB29* se amplificaron a partir de DNA genómico de *Arabidopsis* (ninguno de estos genes tiene intrones) con los cebadores PUB28for: 5'-CATGCCATGGTAAGGAGCGATGATCTTTAC-3' y PUB28rev: 5'-CATGCCATGGTATGTGTTCGTTTGGTTTCG-3'; PUB29for: 5'-CATGCCATGGGGAGAGATGAAACAGAG-3' y PUB29rev: 5'-CATGCCATGGGCATAATATGAGTAGTCTTG-3'; PUB27for: 5'-CATGCCATGGTGAAGAAAGATGATCTCTGC-3' y PUB27rev: 5'-CATGCCATGGTTTAAACGGCATGATATGTG-3'. Los productos de PCR se digirieron con *NcoI*, se rellenaron con Klenow y se clonaron en el sitio *SmaI* del vector pZEX.

Todas las construcciones se transformaron en la cepa BL21(DE3)pLysS de *E. coli* (Stratagene, La Jolla, CA) y se crecieron a 37°C hasta una OD<sub>600</sub>≈0,8. Los cultivos se indujeron para la producción de las proteínas recombinantes por adición de 1 mM IPTG, y se incubaron a 28°C (las fusiones a GST) ó a 37°C (la fusión a Strep-tag) por un periodo de 3 h, tras el cual se centrifugaron los cultivos y se congeló el precipitado bacteriano a -80°C.

### **3.1.- PURIFICACIÓN DE PHOR1-St.**

El sedimento de bacterias se descongeló en hielo y se resuspendió en 20 ml del tampón de extracción frío (100 mM Tris-HCl (pH 8,0); 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,5% Tritón X-100 (TX-100); 1 mM PMSF; 10 µg/ml Aprotinina; 10 µM E-64; 50 µM leupeptina y 1 µM pepstatina, los cuales se adicionaron al tampón justo antes de su uso). La suspensión de bacterias se sonicó brevemente a 0,7 amplitud y a 50 ciclos/seg durante tres veces por 10 seg dejando un tiempo de reposo de 30 seg en hielo entre las distintas sonicaciones. El lisado bacteriano se centrifugó entonces 15 min a 15.000 RPM, y se separó el sobrenadante que se ultracentrifugó 1 h a 40.000 RPM (rotor 50Ti, Beckman). Todos los pasos de extracción y purificación se realizaron a 4°C. Las columnas con 0,5 ml de la resina Strep-Tactin *Sepharose* (IBA) se equilibraron con 5 ml del mismo tampón. Se pasó el sobrenadante de la ultracentrifugación a un tubo de 50 ml y se le adicionó la resina equilibrada, incubando como "batch" por 3 h a 4°C en un agitador orbital. Se centrifugó brevemente para sedimentar la resina, se eliminó el sobrenadante, y se transfirió la resina a una columna, la cual se lavó con 10 ml del tampón de extracción, seguido de 20 ml del mismo tampón sin TX-100. Se cargó la columna con un volumen adecuado de buffer y se guardó a 4°C hasta su utilización.

### **3.2.- PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN A GST.**

Para la extracción y purificación de las proteínas recombinantes fusionadas a GST se usó PBS (10 mM fosfato de sodio; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA pH 7.4) + inhibidores de proteasas. El sedimento bacteriano se descongeló en hielo, se resuspendió en 20 ml del tampón frío y se sonicó como antes. Para disolver las proteínas de fusión agregadas en los cuerpos de inclusión se adicionó 1% de sarcosil y se incubó durante 5-10 min en hielo. Las muestras se ultracentrifugaron a 40.000 RPM y se adicionó TX-100 al sobrenadante, a una concentración final de 4% para secuestrar el sarcosil, dejando incubar las muestras en hielo por 10-15 min. Todos los pasos de extracción, centrifugación y purificación se realizaron a 4°C. Se equilibraron 0,5 ml de la resina Glutathione-Uniflow (Clontech) con 5 ml del tampón de extracción suplementado con 4% TX-100, y ésta se adicionó al sobrenadante de ultracentrifugación. Se incubó en un agitador orbital por 2 h a 4°C, se centrifugó brevemente, y se transfirió la resina de nuevo a una columna. Se realizaron lavados sucesivos disminuyendo gradualmente la concentración del TX-100 hasta eliminarlo del todo. Se cargó la columna con un volumen adecuado de tampón y se guardó a 4°C hasta su utilización.

En todos los casos, para evaluar los niveles de purificación de la proteína de fusión, se tomaron alícuotas del extracto y de la resina, se separaron mediante SDS-PAGE en un gel al 10% de PAA y se visualizó las proteínas por tinción con Coomassie.

#### 4.- ANÁLISIS WESTERN BLOT.

Para la extracción de proteínas totales de plantas, se recogieron 5-6 hojas de roseta de *Arabidopsis* y se congelaron en nitrógeno líquido. Las muestras se homogenizaron en el tampón de extracción (PBS suplementado con 0,1% SDS; 0,1% TX-100; 5 mM  $\beta$ -ME + inhibidores de proteasas) y se centrifugaron 20 min a 13.000 RPM y 4°C. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y la proteína se cuantificó mediante ensayo Bradford (Protein Assay Bio-Rad Lab GmbH München, Germany). Se separaron entre 25 y 50  $\mu$ g de proteína por pocillo en geles de PAA. Las proteínas se transfirieron por una hora a una membrana de nitrocelulosa mediante transferencia semi-seca, utilizando el siguiente tampón transferencia: 1,46 gr Tris; 0,73 gr de Glicina; 0,3 ml SDS (stock 20%) y 50 ml metanol en 250 ml de H<sub>2</sub>O miliQ. Para comprobar una transferencia similar de todos los carriles, las membranas se tiñeron con solución Ponceau.

Para detectar la proteína PHOR1, se utilizó el anticuerpo policlonal descrito por Amador y col., 2001<sup>(5)</sup> en una dilución 1/1000. Para las fusiones a GFP se usó un anticuerpo anti-GFP monoclonal de Roche a una dilución 1/1000. Para la detección de las proteínas DELLA se generó un anticuerpo policlonal (ver más adelante) contra la región DELLA, el cuál se utilizó también a una dilución 1/1000.

Todos los anticuerpos secundarios utilizados estaban conjugados a peroxidasa. Para la detección de PHOR1 y las DELLA se utilizó una IgG anti-conejo a una dilución 1/20,000, y para la detección de las fusiones a GFP una IgG anti-ratón a una dilución de 1/5000 (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Para la reacción de quimioluminiscencia se usó el kit de LiteAblot (EuroClone). Todas las reacciones se realizaron según las especificaciones de los fabricantes.

#### 5.- ANÁLISIS NORTHERN BLOT.

Para la extracción de RNA se utilizaron tubos libres de RNasa y todas las soluciones, a excepción del tampón Z6, se prepararon con H<sub>2</sub>O previamente tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). Para prepararla, se añade el DEPC a dilución 1/1000, se agita durante varias horas y se autoclava dos veces.

Se recogieron 5-6 hojas de roseta de *Arabidopsis* por muestra y se congelaron en nitrógeno líquido. Las hojas congeladas se trituraron con 400  $\mu$ l del tampón Z6 (8 M Guanidina-HCl; 20 mM MES pH 7,0; 20 mM EDTA) suplementado con 10%  $\beta$ -ME y se añadió 400  $\mu$ l de Fenol-Cloroformo. Tras la purificación del RNA, se separaron 15  $\mu$ g de RNA total en un gel al 1,2% de agarosa-formaldehído y se transfirió por capilaridad a membranas de nylon. La hibridación se llevó a cabo de acuerdo con Amasino RM., 1986<sup>(6)</sup>. Los filtros se hibridaron a 42°C y se lavaron en 3XSSC (stock 20X; 3 M NaCl; 0,3 M citrato sódico); 0,5% SDS a 65°C.

Las sondas correspondientes a los genes *PUB27/28/29*, *PHOR1*, *RGL3* y *SYL1*, se obtuvieron por PCR usando los cebadores antes descritos. La sonda *LOX4* fue amablemente cedida por la Dra. Carmen Castresana.

## 6.- ENSAYO DE INTERACCIÓN DE LAS DELLA CON PHOR1.

### 6.1.- TRADUCCIÓN *IN VITRO*.

Para los experimentos de transcripción/traducción *in vitro* se utilizaron construcciones correspondientes a las ORF de las diferentes proteínas, bajo control del promotor T7 en el vector pGBKT7 (Clontech, Palo Alto, CA).

La ORF completa correspondiente a *StRGA* se amplificó por PCR a partir del plásmido *StRGA*-pBluescript utilizando los cebadores FPG1: 5'- CGGG ATCCTGAAGAGAGATCGAGAT-3' y FPG2: 5'- AACTGCAGTTAAGTCAAGTCACATCT-3'. Estos cebadores introducen sitios de restricción *Bam*HI y *Pst*I en ambos extremos (se muestran subrayados), los cuales se utilizaron para clonar el producto de PCR en el vector pGBKT7, generándose la construcción *StRGA*-pGBKT7.

*StSLY1* se amplificó con los cebadores StSLY1-5 y StSLY1-3 (ver más arriba) y se clonó como un fragmento *Eco*RI/*Xho*I en el vector pGBKT7.

La ORF correspondiente a PHOR1 se amplificó a partir de la construcción pBluescript-PHOR1<sup>(5)</sup> usando los cebadores VA24: 5'- GCGGATCCAAATG GTGAGAAATAGGAG-3' y VA25: 5'- AACTGCAGTCAGTAGGGCATAAT GTGAG-3', y se insertó como un fragmento *Bam*HI/*Pst*I en el vector pGBKT7.

La construcción ΔUbox-pGBKT7, con una delección de los aa 10-81 en el dominio U-box, se generó por PCR inversa con el enzima *Taq* polimerasa Long Expand® (Roche), sobre la construcción pUC-PHOR1-GFP<sup>(5)</sup>, usando los cebadores VA20 (residuos 41 a 56): 5'-ATAAGAATGCGGCCGCAAAGG CTGGGAACG-3' y VA21 (residuos 257 a 270): 5'-ATAAGAATGCGG CCGCCGTCGAGCTCACC-3'. Estos cebadores introducen sitios de restricción *Not*I (subrayados) que fueron usados para la digestión y religación. La región codificadora para la proteína PHOR1 ΔU-box se amplificó con los cebadores VA24 y VA25 y el producto de PCR se insertó en el vector pGBKT7 como un fragmento *Bam*HI/*Pst*I.

La construcción ΔDELLA-pGBKT7, carente de los aa 44-87 correspondientes al dominio DELLA, se generó por PCR inversa sobre la construcción *StRGA*-pGBKT7 utilizando los cebadores 11deg: 5- ACACGGTCG ACATTCCTGCATCTGCTG-3' y 12deg: 5'-ACAGCGTCGACTGGTCATAA AAACCC-3'. Estos cebadores introducen sitios *Sal*I de restricción (subrayados), los cuales se usaron para la digestión y posterior religación del plásmido. Todas las construcciones se verificaron mediante secuenciación del DNA.

Los plásmidos *StRGA*-, PHOR1-, *StSLY1*-, ΔUbox- y ΔDELLA-pGBKT7 se transcribieron y tradujeron *in vitro*, en presencia de [<sup>35</sup>S]Met, usando el kit TNT® (Promega, Madison, WI). Para cada reacción se emplearon 2 μg de DNA plasmídico, 25 μl de lisado de reticulocito de conejo, 2 μl del tampón de reacción, 1 μl del enzima T7 RNA polimerasa, 1 μl de la mezcla de aa menos metionina (1 mM), 2 μl de [<sup>35</sup>S] metionina, y 1 μl del inhibidor de ribonucleasas RNasin. La reacción se completó a 50 μl con H<sub>2</sub>O RNase-free, y se incubó durante 90 min a

30°C. Para comprobar la eficiencia de marcaje, se tomó 1 µl de cada una de las reacciones, se adicionó a 10 µl del tampón de carga TMX2, y se separaron en un gel de poliacrilamida al 10%. El gel se secó y se expuso durante la noche, guardando el resto de la reacción en hielo. Tras revelar la película y comprobar que todos los marcajes habían funcionado de forma eficiente, se procedió a la reacción de *pull-down*.

## 6.2.- ENSAYOS DE *PULL-DOWN*.

Para los ensayos de *pull-down*, se incubó 10 µl de las traducciones *in vitro* correspondientes a las proteínas *SrGA*, PHOR1 y *SrSLY1*, con 20 µl de la resina de *Sepharose* con las proteínas de fusión PHOR1-ST, GST-PUB27, GST-PUB28, GST-PUB29 y GST-*SrSLY1* unidas (1 µg de proteína).

Para ello, se equilibró la resina con 500 µl del tampón de interacción (PBS suplementado con 10 mM de fosfato sódico, pH 7,2; 1 mM EDTA; 10% glicerol; 0,05% tergitol; 0,5 mM de PMSF e inhibidores de proteasas) en tubos de 0,5 ml y se centrifugó brevemente, descartando el tampón sobrenadante. Se adicionaron 300 µl del tampón de interacción a cada una de las alícuotas de resina y 10 µl de la reacción de traducción. Esta mezcla se incubó durante 4 h a 4°C, en un agitador orbital y transcurrido este tiempo se centrifugó brevemente los tubos a fin de depositar la resina y descartar los sobrenadantes. La resina se lavó 6 veces con 500 µl del tampón de interacción, centrifugando brevemente entre lavados a fin de eliminar totalmente el tampón de lavado. Tras los lavados se adicionaron 30 µl del tampón de carga TMX2 a cada uno de los tubos, se calentaron 2 min a 100°C y se cargó las proteínas unidas en un gel de poliacrilamida al 10%. Los geles se secaron y las proteínas se detectaron por autoradiografía.

## 7.- AMPLIFICACIÓN Y CLONAJE DE *GAI* Y SUS DIFERENTES FRAGMENTOS DERIVADOS.

La pauta abierta de lectura correspondiente a la proteína *SrGAI* y sus fragmentos derivados se habían clonado previamente en el vector pBridge (Mariana Falcón, tesis doctoral). Para la traducción *in vitro*, estas construcciones se transfirieron al vector pGBKT7, que incluye el promotor T7 frente a la región múltiple de inserción (Fig. 17B).

El clon *SrGAI*-pBridge se obtuvo por amplificación con los cebadores FPG1: 5'-CGGGATCCTGAAGAGAGATCGAGAT-3' y FPG2: 5'-AACTGCAGTTA ACTCAGTCACATCT-3' que introducen dianas *Bam*HI y *Pst*II a ambos extremos, e inserción en estas mismas dianas del vector pBridge. La delección M5 se obtuvo por amplificación con los cebadores M5: 5'-CGGGATCCTAGTTGATT CACAAGAA-3' y FPG2: 5'-AACTGCAGTTAACTCAGTCACATCT-3', con dianas *Bam*HI y *Pst*II a ambos extremos y clonaje en las mismas dianas de pBridge. Los clones en pBridge se digirieron con los enzimas *Bam*HI y *Pst*II y los fragmentos resultantes se clonaron en pGBKT7.

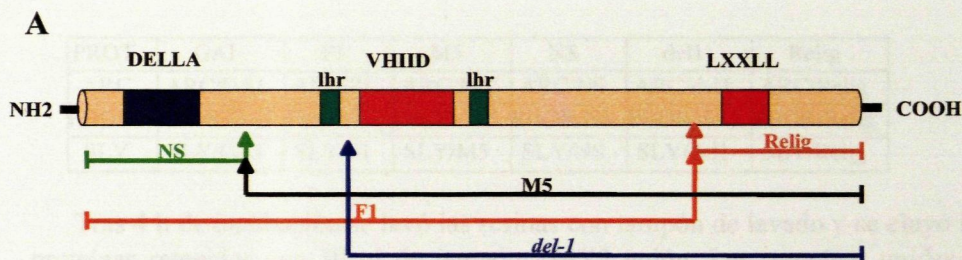
El fragmento *del-1* se generó a partir del clon *SrGAI*-pBridge, utilizando el enzima *Taq* polimerasa Long Expand® (Roche) y los cebadores pBRIDBam: 5'-ACGGATCCCCGGAATTC-3' y pGAIdel1: 5'-CGGGATCCCTACTTACTT

TGCTGAAGC-3', a fin de amplificar el plásmido completo. El producto de amplificación se digirió con el enzima *Bam*HI y se religó para generar la construcción *del-1* en pBridge. Dicha construcción se transfirió al vector pGBKT7 mediante digestión con los enzimas *Bam*HI y *Pst*I, e inserción en estas mismas dianas del vector pGBKT7.

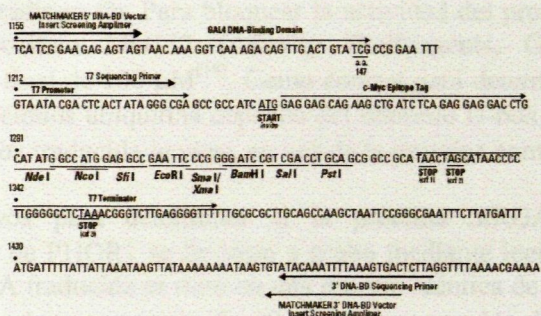
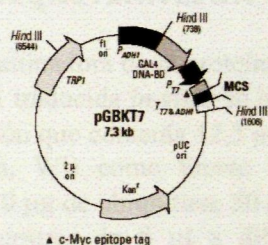
El fragmento NS se obtuvo mediante digestión de la construcción *SrGAI*-pBridge con los enzimas *Bam*HI y *Spe*I. El fragmento liberado se clonó en las dianas *Bam*HI/*Xba*I (produce extremos compatibles con *Spe*I) del vector pUC19, y se liberó luego por digestión con los enzimas *Bam*HI/*Pst*I, insertándose en estas mismas dianas del vector pGBKT7. El fragmento F1 se obtuvo por digestión de la construcción *SrGAI*-pBridge con el enzima *Eco*RI, y el segmento liberado se ligó a esta misma diana en el vector pGBKT7. El producto restante de la digestión (segmento C-terminal del gen unido al vector por la diana *Pst*I) fue religado usando la diana *Eco*RI, generándose así la construcción **Relig**-pBridge (Fig. 17A). Esta construcción se digirió con los enzimas *Eco*RI y *Pst*I y se ligó al vector pGBKT7 digerido con los mismos enzimas dando lugar a **Relig**-pGBKT7.

De las colonias positivas para estas construcciones se preparó un cultivo de 10 ml, y se purificó el plásmido correspondiente mediante el kit de purificación NucleoSpin® (Macherey-Nagel) con el fin de obtener DNA de calidad suficiente para ser utilizado como molde en las reacciones de transcripción/traducción, el cual se guardó a -20°C hasta su uso.





**B**



**Figura17. A**, Diagrama esquemático de la proteína GAI y de sus fragmentos derivados. Los fragmentos NS y M5 se generaron a partir de la diana de corte *Spe* I, en tanto que los fragmentos F1 y Relig se generaron por digestión del clon GAI con *Eco*RI. El fragmento del1 corresponde a una delección menor que M5, que no incluye la primera cremallera de leucinas. **B**, Mapas de los vectores pGBKT7 utilizado para la inserción de GAI y sus fragmentos derivados.

## 8.- TRADUCCIÓN *IN VITRO* Y ENSAYO DE INTERACCIÓN *PULL-DOWN* DE LOS FRAGMENTOS DE *St*RGA.

El marcaje de la proteína *St*RGA y de sus fragmentos derivados se realizó mediante transcripción/traducción *in vitro* utilizando el kit TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega).

El ensayo *pull-down* se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente. Para la interacción se utilizó 20 µl de cada una de las columnas (GST-SLY, GST-ARC1 y PHOR1-ST) y 10 µl de los productos de traducción *in vitro* de las proteínas *St*RGA, F1, M5, NS, del1 y Relig, según todas las combinaciones posibles tal y como se indica en la siguiente tabla:



PROT.	GAI	F1	M5	NS	del1	Relig
ARC	ARC/GAI	ARC/F1	ARC/M5	ARC/NS	ARC/del1	ARC/Relig
PHOR1	PHOR/GAI	PHOR/F1	PHOR/M5	PHOR/NS	PHOR/del1	PHOR/Relig
SLY	SLY/GAI	SLY/F1	SLY/M5	SLY/NS	SLY/del1	SLY/Relig

Tras 4 h de incubación se lavó las resinas con tampón de lavado y se eluyó las proteínas retenidas con 30 µl de tampón TMX2 unión. Las proteínas unidas se separaron en un gel de PAA y se detectaron por autoradiografía.

## 9.- ENSAYOS DE UBIQUITINACIÓN *IN VITRO*.

La actividad auto-ubiquitinadora de la proteína PHOR1 se analizó como sigue: 5 µl de la proteína PHOR1 traducida *in vitro* se incubó durante 2 h a 30°C con 50 µl de una mezcla de reacción que contenía 12,5 µl de lisado reticulocito de conejo (RRL, Promega, Madison, WI) como fuente de los enzimas E1, E2 y del proteasoma; 5 mM ATP; 10 µg de ubiquitina; 50 mM de Tris-HCl pH 7,5 y 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Se recogieron muestras de 8 µl a diferentes tiempos para seguir el transcurso de la reacción y éstas se separaron por SDS-PAGE y se detectaron mediante autoradiografía. Para bloquear la actividad del proteasoma, se añadió el inhibidor específico MG132 (Affinity BioReagents, Golden, CO) a una concentración final de 100 µM<sup>(18)</sup>. Como control para determinar que la actividad de unión de residuos ubiquitina depende del dominio U-box, se utilizó 5 µl de la proteína ΔU-box traducida *in vitro*, en vez de la proteína completa.

Los ensayos para determinar si la proteína *Sr*RGA es una diana de ubiquitinación de PHOR1 se llevaron a acabo mediante incubación de 2 µl de la proteína *Sr*RGA traducida *in vitro* en una mezcla idéntica de reacción. La proteína se incubó sola ó en presencia de 10 µl de las mezclas de traducción *in vitro* correspondientes a las proteínas PHOR1 o ΔU-box como se describió arriba. Como control para determinar que la ubiquitinación de la proteína depende del dominio DELLA, se incubó también la delección M5 ó ΔDELLA en las mismas condiciones que se indican arriba. En aquellos casos en que debido a la eficiencia de marcaje se requirió añadir distintas cantidades de la mezcla de traducción a la reacción, ésta se suplementó con una cantidad adicional de RRL para mantener una concentración final de 12,5 µl de RRL en 50 µl de mezcla de reacción.

## 10.- INTERACCIÓN DE PHOR1 CON GAs.

Para los ensayos de la unión de GAs a la proteína PHOR1, se empleó GA<sub>1</sub> marcada radiactivamente con Carbono14 (<sup>14</sup>C-GA<sub>1</sub>), gentilmente cedida por el Dr. José Luís García Martínez. Las proteínas de fusión PHOR1-ST y GST-GID1 (se utilizó como control positivo) expresadas en bacterias y purificadas mediante unión a sus respectivas resinas, se incubaron en presencia de <sup>14</sup>C-GA<sub>1</sub> y dos tampones distintos de incubación: tampón A (utilizado por el grupo del Dr. Matsuoka para GID1) el cual contenía PBS pH 7,5 suplementado con 10 mM fosfato; 1 mM EDTA; 10% glicerol; 0,05% Tergitol y 1 mM PMSF y tampón B (utilizado en los protocolos de purificación de PHOR1) el cual contenía Tris-HCl pH 7,6; 0,1 M NaCl y 5 mM β-ME. Dos grupos de dos tubos que contenían 40 µl de cada una de las resinas, se equilibraron mediante dos lavados de 300 µl con los tampones de unión y se resuspendieron en un volumen final de 300 µl del tampón

correspondiente. A los tubos se añadió 1 µl de  $^{14}\text{C}$ -GA<sub>1</sub> y éstos se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Las resinas se lavaron 3 veces con 300 µl de los tampones respectivos, y se guardó los eluidos de cada lavado. La resina se resuspendió en 100 µl del tampón correspondiente y se transfirió junto a 100 µl de cada uno de los lavados a viales de centelleo de 5 ml. A cada uno de los viales se añadió 5 ml de líquido de centelleo y se cuantificó la radiactividad de las diferentes muestras en un contador de centelleo.

Para los experimentos en los que se usó el extracto bacteriano crudo, las bacterias se lisaron utilizando una French-Press y se evitó el uso de detergentes que pudieran interferir con la unión de la hormona. 100 µl de los lisados bacterianos correspondientes a las fusiones PHOR1-ST y GST-GID1 ó a las células BL21(DE3)pLysS vacías crecidas en iguales condiciones (se utilizaron como control negativo de la interacción), se incubaron igual que antes en presencia de 1 µl de  $^{14}\text{C}$ -GA<sub>1</sub> durante 1 h a 4°C. Tras la incubación, los lisados se separaron en columnas de filtración en gel NAP5 (Amersham-Pharmacia, Upsala, Sweden) equilibradas con 10 ml del tampón de lisis bacteriano (ver apartado de Expresión y Purificación de proteínas recombinantes). Se añadió 200 µl de tampón a cada uno de los lisados y éstos se cargaron en las columnas, procediendo a un primer lavado de 500 µl cuyo eluido correspondía al volumen vacío de la columna. Se lavó entonces las columnas con 5 fracciones adicionales de 500 µl, las cuales se recogieron en viales independientes. Se añadió 5 ml de líquido de centelleo a cada vial y se cuantificó la radiactividad correspondiente a las distintas fracciones en un contador de centelleo.

## **11- ESTUDIOS DE LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PHOR1-GFP.**

Para la detección de la fluorescencia debida a la fusión PHOR1-GFP, se germinó las semillas de plantas que sobre-expresan esta construcción en placas dMS1X y se crecieron en posición vertical. Después de 3-4 días, las plántulas se transfirieron a placas nuevas con el mismo medio pero suplementado con PAC (Duchefa Biochemie BV, Netherlands) o GA<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI) y se incubaron durante 12-24 h más, también en posición vertical. La señal GFP se observó en raíces, utilizando un microscopio Leica DMR equipado con el módulo de fluorescencia. Las raíces se incubaron con 1 µg/ml DAPI (4',6-Diamino-2-fenil-indol diclorhidrato, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI) para visualizar los núcleos.

Para los tratamientos con brefeldina A (BFA, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI) y citocalasina D (CytD, CALBIOCHEM, Darmstadt, Germany), las plántulas se transfirieron a medio MS1X líquido con las drogas (33 µM y 40 µM respectivamente). Se incubaron durante 1-2 h en este medio y se observaron a intervalos regulares de 15 min para detectar los cambios en la localización de la proteína causados por el tratamiento.

## **12.- ENSAYO DE UNA ASOCIACIÓN DE PHOR1 AL SISTEMA ENDOMEMBRANAS.**

Los experimentos para determinar una posible asociación de PHOR1 a endomembranas se llevaron a cabo según Bassham y Raikhel, 1998<sup>(12)</sup>. Brevemente, las líneas de sobre-expresión de PHOR1-GFP se crecieron en medio MS líquido en agitación por 3 semanas, se recogieron las raíces (aproximadamente 1 gr de material), descartando la parte aérea, y éstas se trituraron directamente en un mortero, en presencia de 5 a 6 volúmenes de tampón de extracción HE: 40 mM de HEPES-KOH pH 7,0; 10 mM KCl; 1 mM EDTA; 400 mM Sacarosa; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 10 µg/ml aprotinina; 10 µM E-64; 50 µM leupeptina y 1 µM pepstatina. Los extractos se filtraron a través de 2 capas de nylon y 2 capas de Miracloth (CALBIOCHEM, Darmstadt, Germany) para separar los restos de tejido y se centrifugaron a 1.000 g por 10 min. Después de las centrifugaciones diferenciales (1.000; 13.000 y 150.000 g) se determinó la asociación de PHOR1 a las membranas. Para esto, las proteínas presentes en cada una de las fracciones P1, P13, P150 y S150 se separaron en un gel al 8% de PAA y se detectó la proteína de fusión PHOR1-GFP mediante western blot con un anticuerpo anti-GFP.

Para la determinación del tipo de asociación que presenta la proteína PHOR1 a membranas, se utilizó el P150 obtenido en el protocolo anterior y se trató con 1 M NaCl; 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 2 M urea y 1% TX-100. Para ello, se resuspendió el sedimento P150 en 3 ml tampón de extracción HE y se separó en 5 fracciones de 0,6 ml en distintos tubos. A cada uno de los tubos se adicionó el volumen necesario de las correspondientes soluciones madre para obtener la concentración final deseada de detergente ó sales:

	Tratamiento	Tampón
Tampón	-	400 µl
5 M NaCl	200 µl	200 µl
1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	100 µl	300 µl
5 M Urea	400 µl	-
10% TX-100	100 µl	300 µl

Las muestras se incubaron a 4°C durante toda la noche en agitación y se centrifugaron nuevamente a 150.000 g por 1 h. De esta forma se obtuvieron dos fracciones (soluble y sedimento) para cada uno de los tratamientos. Se tomó una alícuota de la fracción soluble y se le adicionó el mismo volumen del tampón de carga TM2X, mientras que el sedimento se resuspendió directamente en 1 ml de TM2X. Volúmenes iguales de ambas fracciones se separaron en un gel de PAA al 8% y se detectó la proteína de fusión PHOR1-GFP mediante western utilizando un anticuerpo anti-GFP (Roche).

## **13.- GRADIENTE DE SACAROSA Y COLOCALIZACIÓN CON EL MARCADOR LIPOFÍLICO FM4-64 .**

Para la separación en gradiente de sacarosa se partió del sedimento P150 descrito en el apartado anterior. Dicho sedimento se resuspendió en 3 ml del tampón HE y se colocó sobre un gradiente de sacarosa<sup>(12)</sup> preparado como sigue:

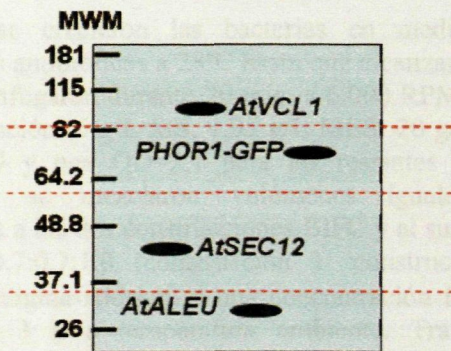


#### 14.- COMPLEMENTACIÓN BIMOLECULAR FLUORESCENTE.

% Sac	ml 60% Sac/HE	HE
54	2,8 ml	0,2 ml
40	4,0 ml	2,0 ml
33	3,3 ml	2,7 ml
24	2,0 ml	3,0 ml
15	1,0 ml	3,0 ml

Los tubos se centrifugaron a 150.000 g en el rotor SW40 (Beckman) por 3 h a 4°C, y se tomaron alícuotas de 500 µl (aprox. 25 muestras) desde el inicio hasta la base del gradiente. Las proteínas presentes en cada una de estas fracciones se precipitaron con 10% de TCA y se centrifugaron a 4°C a 13.000 RPM por 30 min. El sedimento de proteínas se lavó con 1 ml de 100% acetona y se centrifugó de nuevo 30 min a 13.000 RPM. El sedimento blanquecino se dejó secar y se resuspendió en 100 µl de TM2X.

Las fracciones pares del gradiente junto con fracciones correspondientes al S150 y P150 se separaron en un gel de PAA al 8% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para su análisis western blot. La membrana se incubó con anticuerpos específicos frente a los marcadores *AtALEU*, *AtVCL1* y *AtSEC12* (amablemente cedidos por el Dr. Enrique Rojo), para confirmar si PHOR1 co-localiza con alguno de estos marcadores. Para ello, se cortó la membrana de acuerdo a los tamaños esperados tanto para la proteína de fusión como para cada uno de los marcadores, y éstas se incubaron con el anticuerpo correspondiente. El corte de la membrana se realizó como se muestra en la figura 18.



**Figura18.** Esquema representativo de los tamaños moleculares esperados tanto para la proteína de fusión PHOR1-GFP como para las distintas proteínas utilizadas como marcadores del sistema de endomembranas. Para más detalles sobre la función de cada una de las proteínas marcadoras ver Rojo y col (2003). Las líneas punteadas rojas corresponden a los sitios exactos de corte de la membrana.

Los ensayos de co-localización de PHOR1 con el marcador lipofílico FM4-64, fueron realizados en el laboratorio del Dr. František Baluška.



## 14.- COMPLEMENTACIÓN BIMOLECULAR FLUORESCENTE.

Las construcciones utilizadas en los experimentos de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC) se generaron mediante amplificación por PCR de la ORF correspondiente a PHOR1 a partir de la construcción PHOR1-pBluescript utilizando los cebadores PHORYFP-F: 5'-CACCATGGTGAGAA AATAGGAGAG-3' y PHORYFP-R: 5'-GTAGGGCATAATGTGAGTAG-3' y clonaje en el vector pENT/D-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Esta construcción se usó como vector de entrada para el clonaje mediante el sistema Gateway en los vectores pBIFP1, 2, 3 y 4 (gentilmente cedidos por François Parcy), lo que permitió introducir la ORF de PHOR1 bien como una fusión N o C terminal de los fragmentos respectivos N o C terminal de la proteína fluorescente eYFP, generando las 4 fusiones posibles: PHOR1-Nt-eYFP, Nt-eYFP-PHOR1, Ct-eYFP-PHOR1 y PHOR1-Ct-eYFP (Fig. 19). La ORF de *AtRGA* se amplificó a partir del clon de cDNA *AtRGA*-pBluescript, usando los cebadores RGAYFP-F: 5'-CACC ATGAAGAGAGATCATCAC-3' y RGAYFP-R: 5'-GTACGCCGCCGTCGAG AG-3', y se clonó en el vector pENTR/D-TOPO y en los vectores BiFC, como se describe anteriormente. La ORF correspondiente al factor de transcripción PIF4 (este factor interacciona con *AtRGA* y se usó como control positivo) se amplificó a partir de cDNA de *Arabidopsis* usando los cebadores PIF4-F: 5'-CACCATGGAACACCAAGGTTGG-3' y PIF4-R: 5'-TCCGTGGTCCAAAC GAGAACCG-3', y se clonó igual que los anteriores.

Estas construcciones junto con un plásmido de sobre-expresión para la proteína p19, supresora del silenciamiento génico (cedido por el Dr. Juan Antonio García), se transformaron en la cepa pGV3101 de *A. tumefaciens*, y se usó los respectivos cultivos para la agroinfiltración.

Para ello, se crecieron las bacterias en medio YEB líquido con los correspondientes antibióticos a 28°C hasta que alcanzaron una OD de 0,6-0,8. Los cultivos se centrifugaron durante 20 min. a 6.000 RPM y se resuspendieron en el medio de infiltración (5 g/L MS; 1,95 g/L MES; 20 g/L Sacarosa; pH 5,6) a una OD=3 para p19 y una OD=2,1 para las restantes construcciones. Para cada agroinfiltración, se mezclaron volúmenes iguales de las suspensiones correspondientes a las dos construcciones BiFC y al supresor p19, obteniendo una OD final de 0,7:0,7:1,0 (construcción 1: construcción 2: p19). Se añadió acetosiringona (Sigma-Aldrich) a una concentración final 200 µM y se agitó la mezcla durante 3 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se agroinfiltró la cara abaxial de hojas de *N. benthamiana* de 2 semanas de edad con la ayuda de una jeringa, y se transfirió las plantas a un ambiente húmedo y con baja intensidad de luz. La fluorescencia e-YFP se observó a los 2-3 días después de la infiltración. Para ello, se cortó trozos de hoja de aprox. 0,5 cm<sup>2</sup> y se montaron por el envés en un porta, observándolos en el microscopio de fluorescencia utilizando los filtros adecuados para GFP.

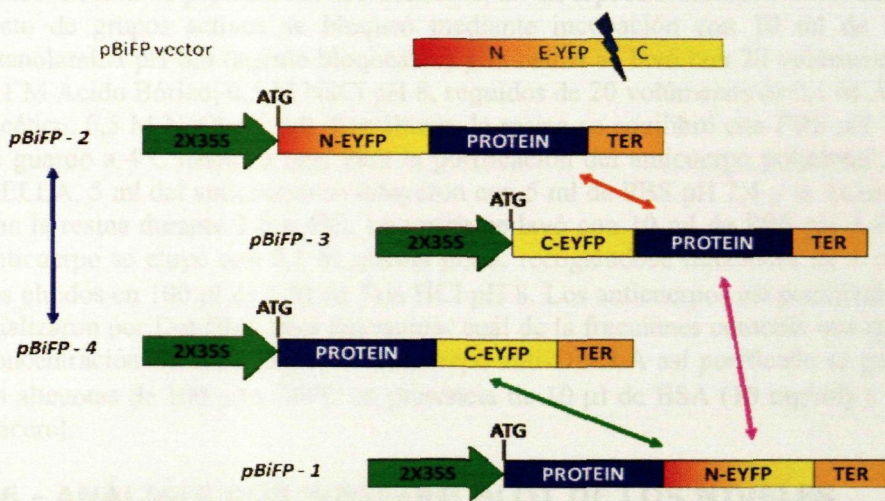
#### 14.- COMPLEMENTACIÓN BIMOLECULAR FLUORESCENTE.

Las construcciones utilizadas en los experimentos de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC) se generaron mediante amplificación por PCR de la ORF correspondiente a PHOR1 a partir de la construcción PHOR1-pBluescript utilizando los cebadores PHORYFP-F: 5'-CACCATGGTGAGAA AATAGGAGAG-3' y PHORYFP-R: 5'-GTAGGGCATAATGTGAGTAG-3' y clonaje en el vector pENT/D-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Esta construcción se usó como vector de entrada para el clonaje mediante el sistema Gateway en los vectores pBIFP1, 2, 3 y 4 (gentilmente cedidos por François Parcy), lo que permitió introducir la ORF de PHOR1 bien como una fusión N o C terminal de los fragmentos respectivos N o C terminal de la proteína fluorescente eYFP, generando las 4 fusiones posibles: PHOR1-Nt-eYFP, Nt-eYFP-PHOR1, Ct-eYFP-PHOR1 y PHOR1-Ct-eYFP (Fig. 19). La ORF de *AtRGA* se amplificó a partir del clon de cDNA *AtRGA*-pBluescript, usando los cebadores RGAYFP-F: 5'-CACC ATGAAGAGAGATCATCAC-3' y RGAYFP-R: 5'-GTACGCCGCCGTCGAG AG-3', y se clonó en el vector pENTR/D-TOPO y en los vectores BiFC, como se describe anteriormente. La ORF correspondiente al factor de transcripción PIF4 (este factor interacciona con *AtRGA* y se usó como control positivo) se amplificó a partir de cDNA de *Arabidopsis* usando los cebadores PIF4-F: 5'-CACCATGGAACACCAAGGTTGG-3' y PIF4-R: 5'-TCCGTGGTCCAAAC GAGAACCG-3', y se clonó igual que los anteriores.

Estas construcciones junto con un plásmido de sobre-expresión para la proteína p19, supresora del silenciamiento génico (cedido por el Dr. Juan Antonio García), se transformaron en la cepa pGV3101 de *A. tumefaciens*, y se usó los respectivos cultivos para la agroinfiltración.

Para ello, se crecieron las bacterias en medio YEB líquido con los correspondientes antibióticos a 28°C hasta que alcanzaron una OD de 0,6-0,8. Los cultivos se centrifugaron durante 20 min. a 6.000 RPM y se resuspendieron en el medio de infiltración (5 g/L MS; 1,95 g/L MES; 20 g/L Sacarosa; pH 5,6) a una OD=3 para p19 y una OD=2,1 para las restantes construcciones. Para cada agroinfiltración, se mezclaron volúmenes iguales de las suspensiones correspondientes a las dos construcciones BiFC y al supresor p19, obteniendo una OD final de 0,7:0,7:1,0 (construcción 1: construcción 2: p19). Se añadió acetosiringona (Sigma-Aldrich) a una concentración final 200 µM y se agitó la mezcla durante 3 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se agroinfiltró la cara abaxial de hojas de *N. benthamiana* de 2 semanas de edad con la ayuda de una jeringa, y se transfirió las plantas a un ambiente húmedo y con baja intensidad de luz. La fluorescencia e-YFP se observó a los 2-3 días después de la infiltración. Para ello, se cortó trozos de hoja de aprox. 0,5 cm<sup>2</sup> y se montaron por el envés en un porta, observándolos en el microscopio de fluorescencia utilizando los filtros adecuados para GFP.





**Figura 19.** Representación esquemática de las construcciones en los vectores BiFC y las posibles combinaciones entre las diferentes construcciones para ensayar la generación de fluorescencia debido a la interacción de las dos proteínas. Las flechas de colores representan cada una de las combinaciones posibles.

## 15.- PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ANTICUERPO ANTI-DELLA.

El fragmento correspondiente a los aa 1-180 de *SrRGA* (incluye el dominio DELLA) fue amplificado por PCR a partir de la construcción *SrRGA*-pGBKT7 usando los cebadores: DELLAfor: 5'-CGGGATCCAAGAGAGATCGAGAT-3' y DELLArev: 5'-GCGTGTCTCGACTGTTAACATGGAAGTTGA, que introducen dianas de restricción *Bam*HI y *Sal*I (subrayadas) en ambos extremos. El producto de PCR se digirió con estas enzimas y se clonó en el vector de expresión pET28a (Novagen, Madison, WI) que expresa el fragmento de la proteína fusionado a un Tag de His. Se transformó células BL21(DE3)pLysS de *E.coli*, con dicha construcción y se crecieron cultivos de 0,5 Lts hasta una OD=0,6. Para inducir la expresión de la proteína se añadió 1 mM IPTG y el cultivo se incubó otras 2 h a 28°C. Las bacterias se sedimentaron por centrifugación a 6.000 RPM durante 15 min y se congelaron a -80°C. La fusión DELLA-His se purificó con la resina Talon Metal Affinity (Clontech, Palo Alto, CA), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. La proteína se eluyó de la resina en presencia de 300 µM Imidazole (Sigma-Aldrich) y se dializó frente a tampón PBS, previamente a la inmunización de los conejos. La proteína purificada se envió al Servicio Científico-técnicos de la Universidad de Barcelona, donde se inmunizaron 2 conejos blancos de Nueva Zelanda y se obtuvo el antisuero correspondiente.

Para la purificación del anticuerpo se unió covalentemente el antígeno DELLA-His a 0,1 g de resina de BrCN (Amersham-Pharmacia, Upsala, Sweden), previamente activada por incubación con 200 ml de 1 mM de HCl y posterior equilibrado con 2 volúmenes de resina de 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>; 0,5 M NaCl; pH 8,3. La resina se incubó toda la noche en un agitador orbital a 4°C en presencia del antígeno y se monitorizó la eficiencia de unión del epítipo midiendo la



concentración de proteína del sobrenadante, en un espectrofotómetro a 260 nm. El resto de grupos activos se bloqueó mediante incubación con 10 ml de 1 M Etanolamina pH 8,0 (agente bloqueante) y la resina se lavó con 20 volúmenes de 0,1 M Ácido Bórico; 0,5 M NaCl pH 8, seguidos de 20 volúmenes de 0,1 M Ácido Acético, 0,5 M NaCl pH 4,0. Por último, la resina se equilibró con PBS pH 7,4 y se guardó a 4°C hasta su uso. Para la purificación del anticuerpo policlonal anti-DELLA, 5 ml del anticuerpo se diluyeron con 5 ml de PBS pH 7,4 y se incubaron con la resina durante 2 h a 4°C. La resina se lavó con 10 ml de PBS pH 7,4 y el anticuerpo se eluyó con 0,1 M glicina pH 3, recogiendo fracciones de 1 ml de los eluidos en 100 µl de 1 M de Tris-HCl pH 8. Los anticuerpos así purificados se analizaron por Dot Blot, para determinar cuál de las fracciones contenía una mayor concentración del anticuerpo. El anticuerpo anti-DELLA así purificado se guardó en alícuotas de 100 µl a -20°C en presencia de 10 µl de BSA (10 mg/ml) y 10% glicerol.

## **16.- ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DE LOS NIVELES ENDÓGENOS DE LAS PROTEÍNAS DELLA.**

Para la determinación de los niveles de acumulación de proteínas DELLA en las líneas *sly1-10*, PHOR1-OE x *sly1-10* y *Ler*, se extrajo las proteínas totales de plántulas de 7 días según el protocolo descrito en el apartado 4. 50 µg de los extractos proteicos totales se separaron mediante SDS-PAGE, utilizando geles en gradiente del 6 al 10% de PAA, lo que aseguró la separación de las proteínas DELLA de otras proteínas que reaccionaban de manera inespecífica con el anticuerpo. Se transfirió las proteínas a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con el anticuerpo anti-DELLA purificado, a una dilución 1/1000. Los pasos posteriores se llevaron a cabo como se describió anteriormente.

## **17.- INFECCIONES DE PLANTAS CON PATÓGENOS BIÓTROFOS Y NECRÓTROFOS.**

Para la infección de plantas con patógenos biótrofos y necrótrofos se contó con la ayuda de la Dra. Carmen Castresana y de Miguel Ángel López. Brevemente, se usaron plantas de 3-4 semanas de edad, crecidas en condiciones de 14 h de luz y 10 h de oscuridad, a una temperatura de 20-22°C. Para las infecciones con biótrofos, se utilizó la cepa bacteriana *Pseudomonas syringae* DC3000 *avrRPM1* cuya inoculación se realizó mediante infiltración en la cara abaxial de las hojas de roseta. Para la infección se utilizó una dilución que incluía  $10^6$  ufc/ml de las bacterias. Para la infección con necrótrofos, se empleó *Botrytis cinerea* a una densidad de  $7 \times 10^5$  esporas/ml. Se depositó 2-3 µl de la suspensión de esporas en la cara adaxial de 2-3 hojas jóvenes de la roseta, a ambos lados del nervio central<sup>(189)</sup> y se incubó las plantas en un ambiente húmedo, en cámaras de cultivo en condiciones controladas (Conviron). Los síntomas se observaron a los 3 días de la infección. En las infecciones con *P. syringae*, el grado de susceptibilidad se determinó como tres posibles niveles de síntomas: un nivel 3 o de mayor susceptibilidad, caracterizado por una progresión de la necrosis con zonas cloróticas avanzadas en el lugar de la inoculación como se observa en el mutante de síntesis de SA, *sid1*; un nivel 2 ó intermedio, caracterizado por la aparición de clorosis claramente marcadas en las zonas de inoculación; y un nivel 1 ó de mayor resistencia, caracterizado por la aparición de escasas zonas cloróticas únicamente

alrededor de la zona inoculada. En el caso de *B. cinerea*, el grado de infección se midió por el área de necrosis y se representó como tres posibles niveles, según el porcentaje de hojas que presentaban necrosis y crecimiento de las hifas.



## ***RESULTADOS.***

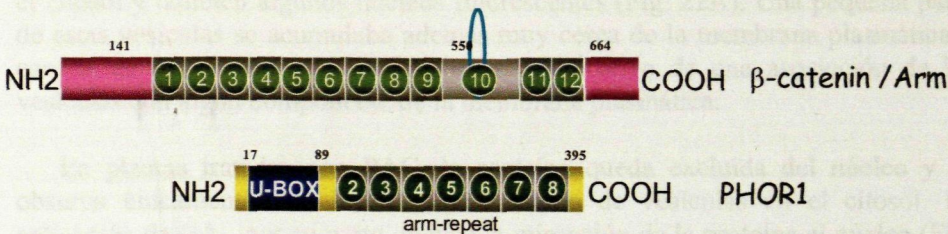


RESULTADOS.

1.- CONSERVACIÓN DE LA FUNCIÓN DE PHOR1 EN *Arabidopsis*.

1.1.- IDENTIFICACIÓN DE LOS ORTÓLOGOS DE PHOR1 EN *Arabidopsis*.

PHOR1 codifica una proteína con un dominio N-terminal U-box y un dominio de repeticiones armadillo (ARM-repeat) en su mitad C-terminal<sup>(5)</sup>, Figura 20. En *Arabidopsis*, se han identificado 61 genes con un dominio U-box, de los cuales 41 presentan también dominios C-terminales ARM-repeat conservados, similares a PHOR1<sup>(142)</sup> (Anexo 4). En animales, la complejidad de esta familia es menor, lo que indicaría que estas proteínas ejercen una función importante en plantas, lo que ha favorecido su diversificación a través de sucesivos eventos de duplicación y posterior especialización. En un análisis filogenético en el cuál PHOR1 se comparó con las secuencias identificadas en *Arabidopsis*, la proteína de patata se agrupó junto a tres miembros de la familia génica de *Arabidopsis* (ver Fig. 15 de la Introducción). Los números de acceso de estos genes son *At5g09800* (*AtPUB27*), *At5g64660* (*AtPUB28*) y *At3g18710* (*AtPUB29*). Estas proteínas comparten entre ellas una identidad del 44-45% y presentan una similitud del 55% con la proteína de patata. Todas ellas muestran una similitud muy alta en el dominio U-box y menor en los dominios ARM-repeat, aunque estos dominios conservan aún los residuos implicados en su plegamiento. Los residuos Ile, Trp y Pro característicos del dominio U-box, con una función en la unión al enzima E2 conjugador de Ub, están conservados en las 4 proteínas, lo que sugiere que todas ellas podrían corresponder a E3 ligasas activas<sup>(79, 111)</sup>. Por otra parte, la homología con otras proteínas U-box/ARM-repeat se restringe al dominio U-box, lo que sugiere que los demás miembros de la familia génica tendrían una función distinta. Curiosamente, los 3 genes de *Arabidopsis* y PHOR1 comparten secuencias aminoacídicas casi idénticas en su extremo C-terminal, lo que apuntaría a una función importante de esta región.

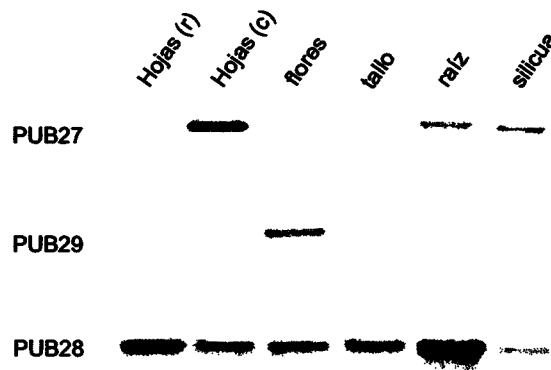


**Figura 20.** Dominios conservados en la proteína PHOR1 de patata y su comparación con la proteína  $\beta$ -catenina de humanos o armadillo de *Drosophila*. En la figura se muestra la distribución de las repeticiones de armadillo (ARM-repeat) en la región C-terminal de la proteína PHOR1 y en las proteínas arquetipo. El dominio ARM-repeat está implicado en interacciones proteína-proteína. El dominio U-box N-terminal une el enzima E2 conjugador de Ub y es necesario para la actividad E3 ligasa.

En análisis northern observamos que *AtPUB27* y *AtPUB28* se expresan en prácticamente todos los tejidos de la planta, mientras que el mRNA *AtPUB29* es más abundante en flores. *AtPUB28*, por otra parte, exhibe un patrón de expresión muy similar al gen PHOR1 en patata<sup>(5)</sup>, mostrando elevados niveles de expresión



en la raíz y en las hojas de la roseta. El mensajero *AtPUB27*, por su parte, se detecta preferentemente en hojas caulinares (Fig. 21).



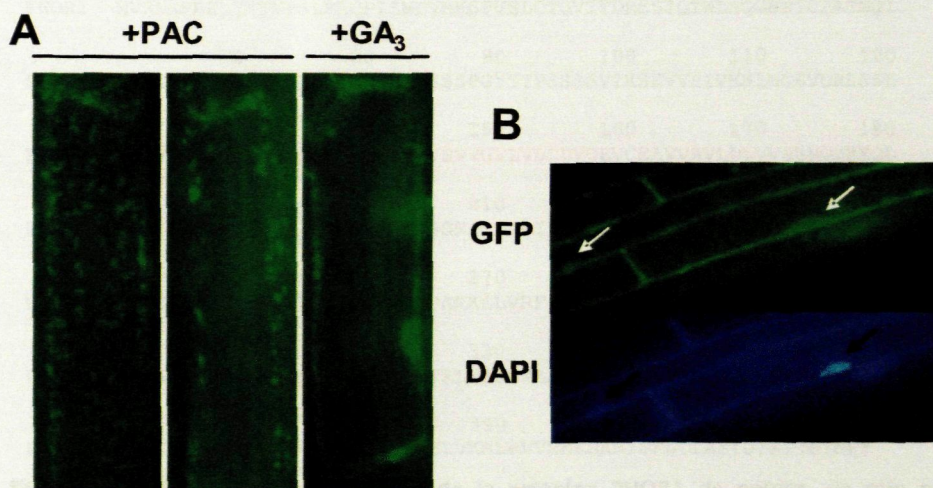
**Figura 21.** Análisis northern de los genes *AtPUB27*, *AtPUB28* y *AtPUB29*. Se extrajo RNA total de hojas de la roseta y caulinares, y de frutos, flores, tallo, raíz y silículas de plantas adultas de *Arabidopsis*. Las membranas se hibridaron con sondas preparadas a partir de los cDNAs para cada uno de los genes.

## 1.2.- MIGRACIÓN AL NÚCLEO DEPENDIENTE DE GAS DE LA FUSIÓN *StPHOR1*-GFP EN *Arabidopsis*.

A fin de determinar si PHOR1 se comporta en *Arabidopsis* igual que como se había observado en patata ó tabaco (ello indicaría una función conservada también en *Arabidopsis*), se generaron plantas transgénicas que expresaran la proteína de fusión PHOR1-GFP bajo control del promotor constitutivo 35S. Se seleccionaron líneas con niveles elevados de fluorescencia, y se trataron con GA<sub>3</sub> ó con el inhibidor de síntesis de GAs paclobutrazol (PAC), a fin de analizar la distribución intracelular de la proteína en respuesta a estos tratamientos (Fig. 22). Se analizó el patrón de fluorescencia en raíces jóvenes en elongación, que no presentan la interferencia de la clorofila. La proteína de fusión PHOR1-GFP mostró en estas células una distribución en pequeñas partículas ó vesículas móviles, repartidas en el citosol y también algunos núcleos fluorescentes (Fig. 22A). Una pequeña parte de estas vesículas se acumulaba además muy cerca de la membrana plasmática y carecía de movimiento, lo que podría ser indicativo de una asociación de las vesículas con algún componente de la membrana plasmática.

En plantas tratadas con PAC, la proteína queda excluida del núcleo y se observa únicamente una localización a modo de vesículas en el citosol. La aplicación de GA<sub>3</sub>, por su parte, induce la migración de la proteína al núcleo (Fig. 22A y 22B), y tras 4 h de incubación, se observa una localización nuclear abundante de la proteína PHOR1-GFP, a la vez que una reducción en el número vesículas citosólicas. Estos resultados son idénticos a los observados en células BY2 de tabaco<sup>(5)</sup> e indican que la proteína de patata es correctamente reconocida por los otros componentes celulares de *Arabidopsis*. Así, se utilizó esta planta modelo en todos los estudios posteriores, ya que en esta especie se dispone de un mayor número de herramientas moleculares y también de mutantes bien caracterizados en la ruta de señalización de GAs.





**Figura 22.** Localización subcelular de la proteína de fusión PHOR1-GFP en raíces transgénicas de *Arabidopsis*. **(A)** Fluorescencia GFP en plántulas de 4 días. Las plántulas se trataron con 10  $\mu$ M PAC durante 8 h antes de observar la fluorescencia GFP y posteriormente se trataron durante 4 h con 100  $\mu$ M de GA<sub>3</sub>. **(B)** Raíces de plántulas transgénicas tratadas con 100  $\mu$ M GA<sub>3</sub> y teñidas con DAPI para identificar los núcleos. Las flechas blancas señalan la localización de la fluorescencia GFP. Las flechas negras señalan la posición de los núcleos teñidos con DAPI.

## 2.- ASOCIACIÓN DE PHOR1 A MEMBRANAS VESICULARES.

### 2.1.- PHOR1 ES UNA PROTEÍNA PERIFÉRICA DE MEMBRANA.

La distribución de la proteína de fusión PHOR1-GFP en estructuras definidas en el citosol, sugiere una asociación de la proteína con el sistema de vesículas endomembrana de la célula. Sin embargo, PHOR1 no presenta en su secuencia aminoacídica ningún péptido señal o dominio transmembrana obvio, ni tampoco secuencias que pudieran funcionar como señales de tránsito a los cloroplastos ó a la mitocondria. A su vez, no se observa ninguna señal de localización nuclear que pudiera señalar su transporte al núcleo, aunque el dominio de repeticiones Armadillo comparte cierta homología con las  $\beta$ -importinas<sup>(5)</sup> implicadas en el transporte de proteínas cargo al núcleo. Por tanto, es posible que al igual que se ha descrito para la  $\beta$ -catenina, la proteína señalice, en presencia de GAs, su propia migración al núcleo.

Con el programa Tmpred (<http://www.ch.embnet.org>) se identificó una región altamente hidrofóbica en la zona central de la proteína PHOR1 (Fig. 23), que podría funcionar a manera de dominio de anclaje a la membrana lipídica. Dicha región puede estar implicada en la asociación al sistema de endomembranas, lo que explicaría la distribución en estructuras discretas en el citosol de la proteína (Fig. 22A).



	10	20	30	40	50	60
PHOR1	MVRNRREELYVTVP	SLFRCPISMDVMKSPV	SLCTGV	TYDRSSIQTWLSQ	GHNTCP	ATMQI
	70	80	90	100	110	120
PHOR1	LPSTDFIPNLT	LRRLIN	VWIHQHPSSSPGY	TTTPSSSSVT	KSEVVEIV	KNLNGEVDRLSSL
	130	140	150	160	170	180
PHOR1	AKIVEFVKCSGENRR	FFVNSSDAIVSVV	GVLVDCDVG	EVCEAVVA	VLDDLVS	SENGVKEQL
	190	200	210	220	230	240
PHOR1	NKEILKSDRKFLPK	FLILRK	GKLSSRIQTARILE	FIALDADSQR	KMIEEQGLLY	ELHVF
	250	260	270	280	290	300
PHOR1	TSTETNRFAIEAGL	STLIAVSTTRPAK	KELVRF	GIVQTIGKILSG	SETARAV	VEKSLKLL
	310	320	330	340	350	360
PHOR1	ETVATCTEGRAAIV	KGEECMSAIV	TRLMKSSKAATEH	GVTVLWSV	CCFLRDTA	ARDVVGK
	370	380	390	400	410	
PHOR1	ANGLTKVLLVMQSD	CSAAVRQMCGELV	KALRVVNNKHKNYS	SKSCLASYDTKT	THIMPY	

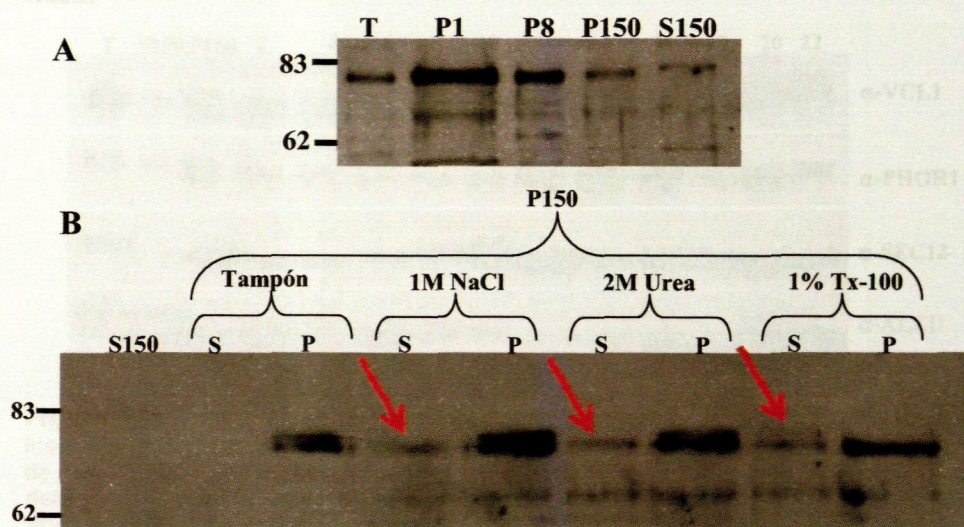
**Figura 23.** Secuencia aminoacídica de la proteína PHOR1 de patata, en rojo se resalta la región hidrofóbica (aa 136-157) identificada mediante el programa TMpred. Aunque la proteína no presenta péptido señal, esta región podría funcionar como anclaje a la membrana plasmática o al sistema de endomembranas.

Muchas proteínas integrales del sistema endomembranas funcionan en procesos relacionados con transporte intracelular, regulando el tráfico de vesículas desde el retículo endoplásmico a la membrana celular<sup>(12, 137)</sup>. Anticuerpos específicos frente a estas proteínas pueden se han utilizado como marcadores de los diferentes componentes vesiculares del sistema endomembrana y los hemos utilizado también en este trabajo para determinar el tipo de vesícula a las que PHOR1 se encuentra asociada. En un primer análisis estudiamos si la proteína co-localiza con la fracción microsomal y si corresponde a una proteína integral ó periférica de membrana. Para ello, se realizaron estudios de centrifugación diferencial y como se muestra en la figura 24A, se observó que una parte importante de la proteína PHOR1-GFP fraccionaba con en el precipitado P1 de baja revolución (1.000 g) en el que se separan los restos de tejido junto con la fracción nuclear y una parte de los plastidios. El resto de la proteína se distribuyó en los precipitados de media (P8) y alta revolución (P150), correspondientes a los organelos y la fracción microsomal. La localización de la proteína de fusión en la fracción P1 nuclear estaría de acuerdo con los resultados de microscopía de fluorescencia, e indicaría que en ausencia de un tratamiento con PAC, una parte de la proteína se sitúa en el núcleo, debido a la señalización mediada por las GAs endógenas. La localización de la proteína en las fracciones P8 y P150, por su parte, indica que PHOR1 es también una proteína microsomal. No se detectó apenas proteína en el sobrenadante de alta revolución (S150 o fracción citosólica soluble), lo que demuestra que ésta proteína no se encuentra libre en el citosol.

A su vez, en los estudios de solubilización diferencial de los precipitados de alta revolución (P150) en presencia de NaCl, urea (disocian las proteínas periféricas) ó TX-100 (se disocian también las proteínas integrales de membrana), observamos que tanto el tratamiento con NaCl, como el tratamiento con urea son capaces de solubilizar la proteína, aunque en grado variable. El tratamiento con TX-100, por su parte, también disuelve la proteína pero es capaz de extraer una banda de mayor peso molecular que no aparece en los otros tratamientos (Fig. 24B). Dicha banda podría corresponder a una forma modificada de la proteína, que le confiere un mayor anclaje a la membrana ó complejo asociado.



Extracciones con el propio tampón no liberan la proteína y sirvieron como control de los tratamientos. Este comportamiento se asemeja al observado previamente para proteínas periféricas como *AtVPS45* y es claramente distinto al observado para la proteína *AtSYP21* integral de membrana, que se extrae exclusivamente tras el tratamiento con TX-100<sup>(137)</sup>. De estos resultados podemos deducir que la proteína PHOR1 no es una proteína integral de membrana sino que se encuentra periféricamente asociada a ésta, probablemente a través de una interacción proteína-proteína con un segundo polipéptido anclado a la membrana.



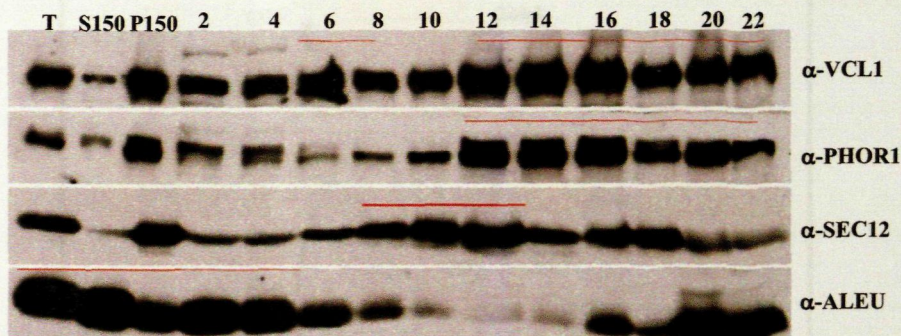
**Figura 24.** Asociación de PHOR1 a endomembranas. **(A)** Fraccionamiento microsomal mediante centrifugación diferencial de extractos de raíces de plantas de *Arabidopsis* que sobre-expresan la proteína de fusión PHOR1-GFP. Los extractos se separaron en fracciones nucleares de 1.000 g (P1) y fracciones de membrana de 8.000 g (P8), 150.000 g (P150) y en la fracción soluble (S150). **(B)** PHOR1 es una proteína periférica de membrana. El pellet P150 se solubilizó en el propio tampón, ó con soluciones 1 M NaCl; 2 M urea ó 1% TX-100. El material insoluble se precipitó de nuevo a alta revolución y se analizaron las fracciones solubles (S) y el precipitado (P). Las fracciones se separaron mediante SDS-PAGE y detectaron por western blot con un anticuerpo anti-PHOR1. Se cargaron cantidades proporcionales de cada una de las fracciones. A la izquierda de cada imagen se muestra la posición de las bandas correspondientes al marcador de peso molecular.

## 2.2.- PHOR1 ESTA ASOCIADA A ENDOSOMAS DE ALTA DENSIDAD.

A fin de identificar la naturaleza de las membranas observadas, se llevó a cabo un ensayo de fraccionamiento subcelular mediante centrifugación diferencial en gradientes de sacarosa, seguido de la detección de las diferentes fracciones con anticuerpos dirigidos frente a las proteínas marcadoras *AtVCL1*, *AtSEC12* y *AtALEU* de *Arabidopsis*, de localización conocida<sup>(137)</sup>. Como se muestra en la figura 25, la proteína PHOR1-GFP se localiza en el precipitado de alta revolución (P150) junto a los marcadores *AtVCL1* y *AtSEC12*. La proteína *AtALEU*, por el contrario, bandea mayoritariamente en la fracción soluble (S150). Una cantidad residual de estas proteínas se observó también en las fracciones S150 y P150, debido a un problema de arrastre ó contaminación durante la separación. Sin embargo, ello no impidió observar un enriquecimiento notable de las proteínas



*AtVCL1*, *AtSEC12* y PHOR1 en la fracción P150, y una localización mayoritaria de *AtALEU* en la fracción S150. Por su parte, PHOR1 se distribuyó en las fracciones más densas del gradiente, junto al marcador periférico de vacuola y fracción pre-vacuolar, *AtVCL1*. El marcador integral de retículo endoplásmico *AtSEC2* mostró una distribución claramente independiente. Estos resultados, por tanto, excluyen una asociación de PHOR1 con la membrana de retículo endoplásmico y demuestran una localización de la proteína en vesículas implicadas en el tráfico entre Golgi y la membrana plasmática ó en vesículas líticas.



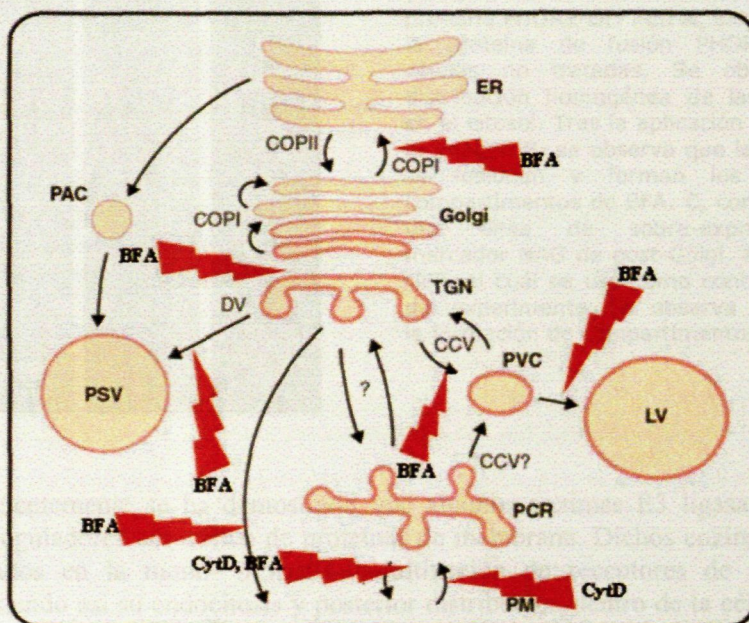
**Figura 25.** Separación en un gradiente lineal de sacarosa de la fracción microsomal insoluble (P150) de extractos de raíces de *Arabidopsis* que sobre-expresan la proteína de fusión PHOR1-GFP. Las fracciones obtenidas se analizaron por SDS-PAGE y se detectaron mediante western blot con los anticuerpos específicos anti-PHOR1 y anti-*AtVCL1*, *AtSEC12* y *AtALEU*.

### 2.3.- PHOR1 ESTA ASOCIADA A VESÍCULAS DE TRÁFICO INTRACELULAR.

El sistema de endomembranas de la célula comprende tanto organelos implicados en la ruta secretora como los implicados en la ruta endocítica, e incluye el retículo endoplásmico (ER), el aparato de Golgi, la red *trans*-Golgi (TGN), los compartimentos prevacuolares (PVC), los compartimentos lítico (lisosomas ó vacuolas) y los endosomas. La red *trans*-Golgi funciona como punto de intersección de las vías anterógradas de tráfico intracelular a la membrana plasmática y la vacuola, y también integra la ruta endocítica. En esta red de membranas, las proteínas que llegan desde el ER ó desde la superficie celular son separadas y empaquetadas en distintas vesículas que luego son enviadas a sus respectivos destinos en la membrana plasmática (MP), las vesículas de almacenamiento (PSV ó *protein storage vesicles*) ó el compartimento prevacuolar (PVC), para ser degradadas una vez han realizado su función<sup>(169)</sup> (Fig. 26). La aplicación de la droga *brefeldina A* (BFA) afecta el sistema endomembranas, bloqueando el tráfico normal tanto de proteínas secretadas como el de proteínas endocitadas (Fig. 26). Se ha reportado que BFA inhibe la activación del factor de ADP ribosilación Arf1 por los factores GEFs tipo Sec7, inhibiendo la formación de Arf-GTP y el tráfico retrógrado entre Golgi y el retículo endoplásmico<sup>(118, 133)</sup>. Este inhibidor interfiere también con el tráfico de vesículas en la red TGN, formando unos agregados de membrana con una localización perinuclear, conocidos como compartimentos de BFA<sup>(46, 47)</sup>. Estudios más recientes han demostrado que BFA interfiere a su vez con el tráfico de vesículas endocíticas, produciendo una fusión de estas vesículas y la formación de agregados BFA de



morfología similar. El tratamiento con citocalasina D (CytD), por otra parte, bloquea la polimerización de los filamentos de actina, bloqueando el transporte vesicular dependiente de actina<sup>(55)</sup>.



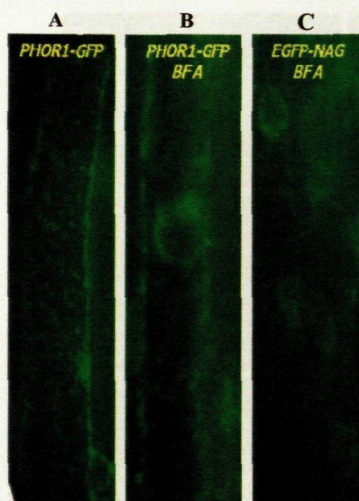
Current Opinion in Plant Biology

**Figura 26.** Los principales organelos del sistema de endomembrana y la ruta de intercambio de membrana que las conectan. Las proteínas son sintetizadas en el RE (ER) y viajan a través del Golgi hacia el *trans*-Golgi (TGN). Desde ahí son distribuidas hacia la membrana plasmática (PM), los compartimentos per-vacuolares (PVC) o las vesículas de almacenaje de proteínas (PSV). Los PVC son las antecámaras de la vacuola lítica (LV) y sirven como un compartimento de reciclaje para la distribución de receptores. Las vesículas densas (DV) no están formadas por capas sino por la agregación de proteínas cargo. Una ruta alternativa dentro de PSV para ciertas proteínas de almacenaje las dirige directamente desde el ER vía vesículas de acumulación precursoras (PAC). La relación entre PCR (presumiblemente corresponde a endosomas en células animales)/endosoma y otras organelos post-Golgi es aun desconocida. En el transporte anterógrado a través del Golgi y dentro del TGN no están involucradas vesículas sino que se lleva a cabo por maduración de cisternas. Las flechas rojas representan el bloqueo hipotético de las drogas BFA y CytD. Adaptado de Nebenführ A., **Current Opinion in Plant Biology** (2002).

Cuando se trataron las líneas de *Arabidopsis* que expresan la construcción PHOR1-GFP con estos inhibidores, se observó que en respuesta a BFA ocurre una redistribución de la fluorescencia para formar los llamados cuerpos de BFA (Fig. 27), lo que estaría de acuerdo con una localización de la proteína en membranas de tráfico intracelular. Por su parte, el tratamiento con CytD produce el cese del movimiento que acompaña a las vesículas donde se localiza PHOR1, lo que indicaría que estas vesículas son transportadas a través de filamentos de actina y no de tubulina<sup>2</sup>.

<sup>2</sup> El tratamiento con Citocalasina D fue grabado en video y es adjuntado como CD en el respectivo anexo.

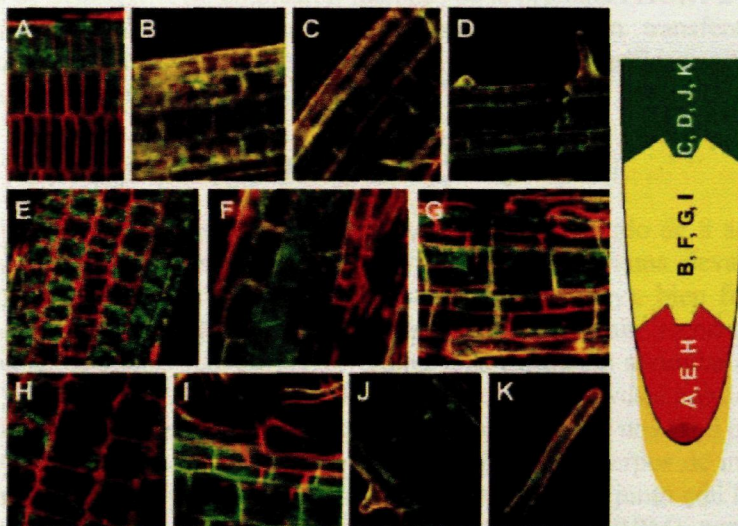




**Figura 27.** Efecto de la brefeldina A (BFA) en la localización subcelular de la proteína PHOR1-GFP. En **A**, localización de la proteína de fusión PHOR1-GFP en células no tratadas. Se observa una distribución homogénea de las vesículas en el citosol. Tras la aplicación de BFA, en la imagen **B**, se observa que las vesículas se fusionan y forman los conocidos compartimentos de BFA. **C**, corresponde a una línea de sobre-expresión del marcador NAG de post-Golgi fusionado a GFP, el cuál se usó como control positivo del experimento. Se observa claramente la formación de compartimentos de BFA.

Recientemente se ha demostrado que algunos enzimas E3 ligasa funcionan como reguladores del tráfico de proteínas de membrana. Dichos enzimas estarían implicados en la mono- ó multi-ubiquitinación de receptores de membrana, favoreciendo así su endocitosis y posterior distribución dentro de la célula<sup>(27)</sup>. Por tanto, a fin de identificar si las vesículas formadas por la proteína PHOR1 podrían corresponder a vesículas de endocitosis ó endosomas tempranos se trató las plantas PHOR1-GFP con el marcador lipofílico de membrana FM4-64. Dicho marcador se ha utilizado de manera rutinaria en estudios relacionados con la ruta endocítica en levaduras y también en plantas, debido a que emite fluorescencia roja únicamente tras su asociación a la MP. Ello permite seguir el proceso de internalización por la formación de organelos fluorescentes punteados<sup>(55)</sup>. Cuando incubó las plantas con éste marcador y se analizó a diferentes tiempos la co-localización de este fluorocromo y la proteína GFP se vio, como se muestra en la figura 28, una localización diferente para ambas fluorescencias en los primeros 5 a 10 min de incubación (Fig. 28A, E, F, H e I). Sin embargo, tras 15 a 20 min del tratamiento, se observan claramente vesículas de color anaranjado, indicativas de una co-localización del marcador FM4-64 (rojo) y la proteína PHOR1-GFP (verde) en las mismas vesículas (Fig. 28B, C, D, G, J y K). Ello nos indicaría que es probable que PHOR1 no participe en los pasos tempranos de la formación de vesículas endocíticas a partir de la PM, pero sin embargo podría modular el tráfico de alguna proteína de membrana en fases posteriores, durante la formación de endosomas tardíos. Curiosamente, en estos estudios observamos que en las zonas maduras de la raíz y en los pelos radiculares (Fig. 28C, J y K), así como en algunas zonas en elongación (Fig. 28B, F, G e I), la proteína PHOR1 se asociaría también a la MP, tal y como indica la coloración anaranjada de dichas membranas.





**Figura 28.** Marcaje con FM4-64. Imágenes tomadas con el microscopio confocal de raíces de *Arabidopsis* que sobre-expresan la proteína de fusión PHOR1-GFP. En el gráfico de la derecha se muestra la zona utilizada para tomar las fotos de la izquierda. A, E, F, H e I corresponden a 5 y 10 min. de tratamiento con FM4-64. Las fotos B, C, D, G, J y K corresponden a tiempos más largos (15 -20 min).

Por consiguiente, los resultados obtenidos del conjunto de estos estudios nos indican que la proteína PHOR1 se encuentra asociada de forma periférica a membranas de endosomas de alta densidad ó endosomas tardíos, uniéndose posiblemente a alguna proteína integral de estas vesículas de tráfico para regular su función.

## 2. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.

Resultados previos obtenidos en patata, indicaban que PHOR1 podría actuar como un regulador positivo de la señal de GAs. Estos resultados, junto con la posterior identificación de las proteínas con un dominio U-box como una nueva clase de enzimas E3 ligasa nos llevó a postular que PHOR1 podría estar implicada en la ubiquitinación de las proteínas represoras DELLA, señalizando su degradación por el sistema 26S proteasoma a través de una vía alternativa a la vía ya descrita, comprendida por el complejo SCF<sup>SLY</sup>. En línea con esta hipótesis observamos que los mutantes *sly1-10* que carecen de la subunidad F-box que reconoce las proteínas DELLA para ser ubiquitinadas por dicho complejo, no muestran un fenotipo enano tan severo como el de los mutantes *gal-3*, con un bloqueo temprano en la ruta de biosíntesis de GAs. Ello podía interpretarse como una evidencia indirecta de una ruta alternativa de degradación de dichos represores.

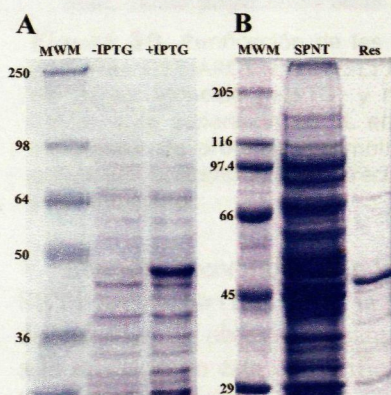
Como primera aproximación para investigar esta hipótesis, nos planteamos analizar si la proteína PHOR1 y sus homólogos PUB27/28/29 de *Arabidopsis* interaccionan con los represores DELLA en ensayos de interacción *in vitro* o *pull-down*. Para ello se expresaron las proteínas de interés en bacterias, fusionadas a un "tag" ó proteína de fusión que permitiera su posterior purificación y/o unión a



matrices de *Sepharose*. Se emplearon fusiones de la proteína PHOR1 a Strep-tag y fusiones de las demás proteínas a la proteína glutatión transferasa (GST), obteniéndose las correspondientes resinas con la proteína purificada tal y como se detalla a continuación.

### 3.1.- PHOR1::Strep-tag.

El sistema Strep-tag se basa en la presencia de un péptido de 8 aa (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) ó péptido *Strep-tag* II<sup>(146)</sup> (St) con una elevada afinidad por la matriz Strep-Tactin *Sepharose* (IBA BioTAGnology), bien fusionado al extremo N-terminal ó C-terminal de la proteína, lo que permite su purificación en presencia de tampones suaves, preservando así su estructura secundaria. Como se observa en la figura 29A, con este sistema se obtuvieron niveles considerables de expresión y una ausencia de expresión basal, lo que permitió una fácil purificación de la proteína, la cuál se mantenía soluble y no formaba cuerpos de inclusión. El grado de pureza de la proteína fue también muy alta, lo que junto con la inclusión de un paso de centrifugación a alta velocidad (40.000 RPM) para evitar la colmatación de las columnas, y la adición de detergentes al tampón de extracción, nos permitió obtener la proteína de fusión PHOR1-St en cantidad y pureza suficientes para los posteriores ensayos de interacción (Fig. 29B).



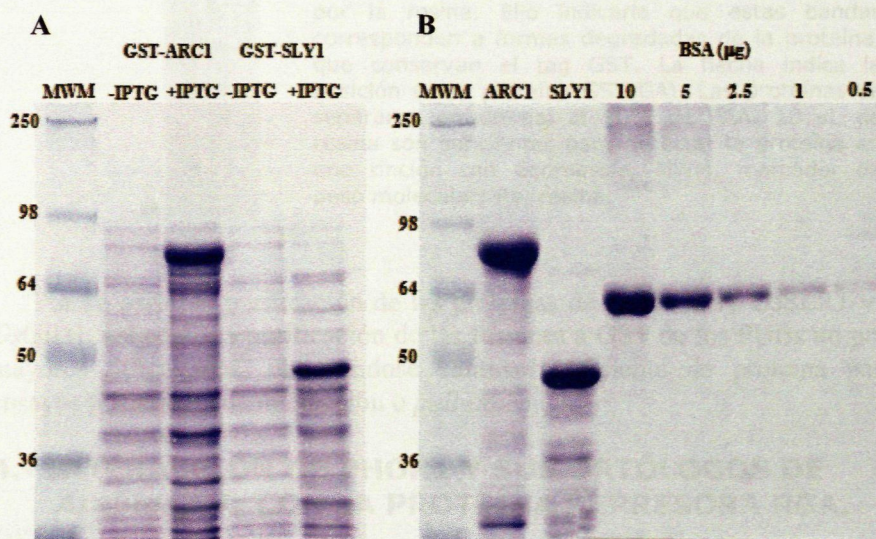
**Figura 29.** Expresión y purificación de la proteína recombinante PHOR1-St. **(A)** El sedimento de una alícuota de 1 ml de cultivo se resuspendió en 400  $\mu$ l de TM2X y se cargaron 20  $\mu$ l de las fracciones inducidas (+IPTG) y no inducidas (-IPTG). **(B)** Fracciones correspondientes al sobrenadante no retenido por la resina (SPNT, 10  $\mu$ l) y a la resina después de ser incubada con el extracto proteico y de varios lavados (Res. 10  $\mu$ l). **MWM**, Marcador de peso molecular. Las proteínas se separaron en un gel de PAA al 10%.

### 3.2.- FUSIONES DE LAS PROTEÍNAS *BnARC1*, *AtSLY1*, *OsGID1*, *AtGAI*, y *AtPUB27*, *AtPUB28*, *AtPUB29* A GST.

Estas proteínas, a diferencia de la fusión de PHOR1-St, presentaron niveles relativamente elevados de expresión basal y una acumulación en cuerpos de inclusión. Aunque dicha expresión basal se redujo considerablemente al añadir glucosa al medio de cultivo (ver materiales y métodos), esto no evitó la formación de cuerpos de inclusión aún cuando se utilizaron concentraciones elevadas de glucosa. Sin embargo, sí se aumentó considerablemente los niveles de expresión de las proteínas fusionadas a GST (Fig. 30A). A fin de recuperar la proteína de los cuerpos insolubles de inclusión, se utilizó sarcosil en el tampón de extracción, un detergente iónico cuya utilización ha sido anteriormente descrita en protocolos de purificación de proteínas fusionadas a GST<sup>(40)</sup>. A la proteína solubilizada, se le añadió una cantidad elevada de TX-100, que secuestra el sarcosil en micelas de manera que no interfiere con la unión de la proteína a la columna de glutathione-*Sepharose* (Fig. 30B). A su vez, los extractos se sonicaron el mínimo tiempo



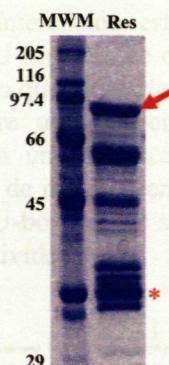
posible ya que se observó que al aumentar el tiempo de sonicación se desnaturaliza la proteína de fusión y ésta no se une a la resina. De esta manera, se consiguió purificar las proteínas de fusión en cantidad suficiente y con un bajo porcentaje de degradación.



**Figura 30.** Purificación de las proteínas fusionadas a GST. **(A)** Expresión de las proteínas GST-ARC1 y GST-SLY1. El sedimento de una alícuota de 1 ml del medio de cultivo inducido (+IPTG) y no inducido (-IPTG) se resuspendió en 200 µL de TM2X, y se separaron 20 µL en un gel de PAA al 8%. **(B)** Cuantificación de las cantidades de proteína recombinante unida a la resina de glutathione-Sepharose, utilizando concentraciones crecientes de BSA como patrón. MWM, marcador de peso molecular.

Aunque el rendimiento en la purificación de las proteínas GST-ARC1 y GST-SLY1 fue bueno (Fig. 30B), la purificación de la proteína GST-GAI presentó más dificultades. Se obtuvieron cantidades relativamente elevadas de la proteína unida a la resina, pero ésta co-purificaba con otras proteínas de menor peso molecular. Se utilizó glutatión reducido a una concentración 5 mM para reducir la unión inespecífica de proteínas a la resina, pero aún así las bandas de menor peso molecular aparecieron en similar proporción. Es pues posible que estas bandas adicionales correspondan a formas degradadas de la proteína GAI con el tag GST (Fig. 31), por lo que esta resina se utilizó en los posteriores ensayos de interacción.





**Figura 31.** Purificación de la proteína recombinante GST-GAI. Se observan bandas contaminantes de menor peso molecular, incluyendo la propia proteína GST de 29 KDa (asterisco), las cuales presentan una alta afinidad por la resina. Ello indicaría que estas bandas corresponden a formas degradadas de la proteína, que conservan el tag GST. La flecha indica la posición de la proteína GST-GAI. Las proteínas se separaron en un gel al 10% de PAA. 10  $\mu$ L de resina son suficientes para detectar la proteína en una tinción con Coomassie. MWM, marcador de peso molecular; Re, resina.

Por su parte, la purificación de las proteínas de fusión GST-*OsSLR1* y GST-*OsGID1*, así como la purificación de las fusiones a GST de los PUBs no presentó mayores dificultades, obteniéndose cantidad suficiente de proteína para los ensayos posteriores de interacción o *pull-down*<sup>3</sup>.

#### 4.- INTERACCIÓN DE PHOR1 Y SUS ORTÓLOGOS DE *Arabidopsis* CON LA PROTEÍNA REPRESORA RGA.

Una vez obtenidas las distintas proteínas de fusión, se realizaron ensayos de interacción *pull-down* y ensayos *in vivo*, que demostraran una posible interacción entre la proteína PHOR1 y los represores DELLA.

##### 4.1.- INTERACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS PHOR1 Y RGA EN ENSAYOS *PULL-DOWN*.

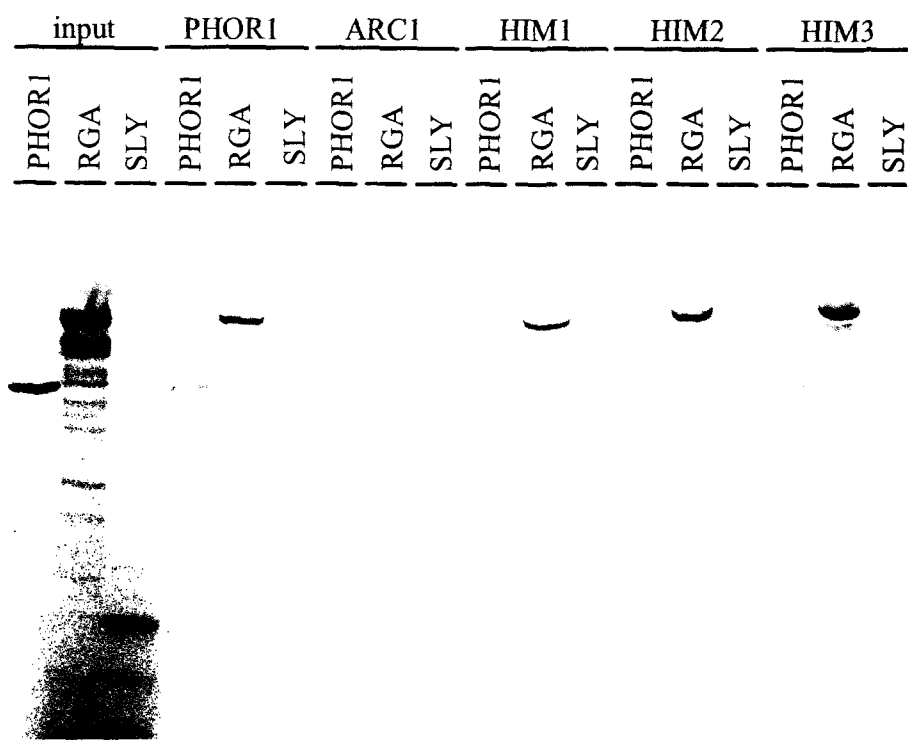
Para los ensayos *pull-down* se empleó como cebo las proteínas expresadas en *E.coli* y las proteínas traducidas *in vitro* en presencia de <sup>35</sup>S-metionina como presa. Como control de interacción de utilizaron las proteínas ARC1 de *Brassica* y SLY1 de *Arabidopsis*. ARC1 codifica una U-box/ARM-repeat no relacionada, implicada en la auto-incompatibilidad del polen<sup>(156)</sup> y se utilizó como control negativo de la interacción. SLY1, a su vez, codifica la subunidad F-box que une las proteínas DELLA al complejo SCF<sup>SLY</sup> y se utilizó como control positivo. Analizamos también si existía algún tipo de interacción entre SLY1 y PHOR1. Las proteínas recombinantes GST-ARC1, GST-SLY, PHOR1-St y GST-PUB27/28/29 unidas a la resina se incubaron con las proteínas PHOR1, RGA y SLY1 marcadas con <sup>35</sup>S-metionina. Tras varios lavados de la resina, ésta se separó en geles SDS-PAGE y las proteínas retenidas se detectaron mediante autoradiografía.

Como se muestra en la figura 32, la proteína RGA marcada era retenida tanto por la resina PHOR1-St como por las resinas correspondientes a las fusiones GST de los PUBs y GST-SLY1. Sin embargo, no se observó interacción con el control negativo ARC1. Curiosamente, la proteína PHOR1 marcada se unió tanto a la resina PHOR1-St, como a las resinas correspondientes a las fusiones GST-PUBs, lo que indicaría que éstas proteínas forman dímeros. Es significativo que una dimerización similar no se observa para la proteína GST-ARC1, lo que sugiere

<sup>3</sup> Las fotos correspondientes a las expresiones y purificaciones de estas proteínas recombinantes no se muestran por motivos de espacio.



que esta interacción está restringida a miembros de la misma subfamilia de proteínas U-box. No se observó ningún tipo de interacción con la proteína SLY1 marcada, lo que indicaría que la actividad E3 ligasa de las proteínas PHOR1/PUBs no requiere una participación de la subunidad F-box. Así, estos resultados demuestran una interacción directa entre las proteínas PHOR1 y RGA, y la formación de dímeros entre los diferentes miembros de la subfamilia PHOR1 de proteínas U-box, lo que sugiere que la dimerización de estas proteínas es necesaria para su actividad.



**Figura 32.** Ensayo de interacción *pull-down* entre las proteínas PHOR1 y RGA. Se utilizaron las proteínas recombinantes PHOR1-St, GST-ARC1 y GST-AtPUBs y las proteínas PHOR1, StSLY1 y StRGA traducidas *in vitro* en presencia de <sup>35</sup>S-metionina. Se utilizó aprox. 1 µg de la proteína recombinante unida a la matriz de *Sepharose* para cada una de las incubaciones. Tras varios lavados, las resinas se separaron en un gel de PAA al 10%. Las proteínas retenidas se detectaron mediante autoradiografía. Se cargó 1 µL de las reacciones de traducción como control de la cantidad de proteína marcada añadida (input).

#### 4.2.- IDENTIFICACIÓN DE LOS DOMINIOS DE LA PROTEÍNA RGA RECONOCIDOS POR PHOR1.

A fin de identificar el dominio de las proteínas DELLA implicado en la interacción con PHOR1, se llevaron a cabo ensayos *pull-down* adicionales en los que se incubó las proteínas recombinantes GST-ARC1, PHOR1-St y GST-SLY1 unidas a la matriz de *Sepharose* con distintas formas trucadas de la proteína RGA marcadas con <sup>35</sup>S-metionina. Se utilizaron distintas construcciones correspondientes a deleciones en las regiones N-terminal y C-terminal de la proteína (Fig. 33A y materiales y métodos). Éstas se utilizaron como molde en

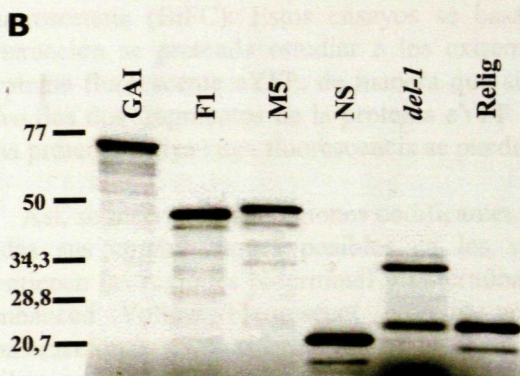
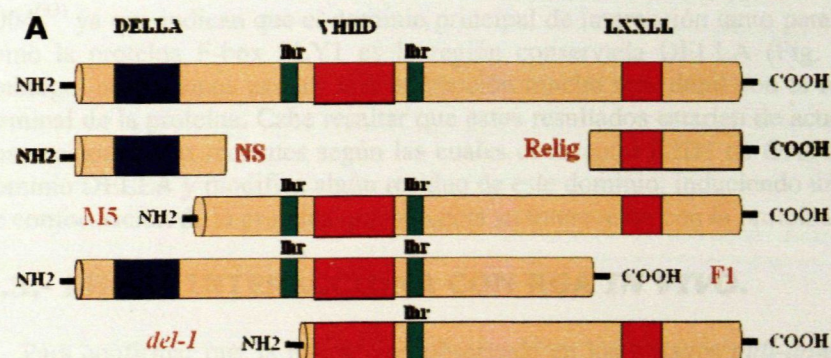


reacciones de transcripción-traducción *in vitro* y se comprobó en todos los casos que el marcaje de las proteínas truncadas era adecuado (Fig. 33B).

Las proteínas truncadas marcadas se incubaron con las resinas GST-ARC1 (control negativo de interacción), PHOR1-St y GST-SLY1. En ensayos doble híbrido en levadura se había demostrado que la proteína F-box SLY1 interacciona con un motivo presente en el dominio C-terminal GRAS de los represores DELLA, pero no se pudo observar una interacción con el propio dominio DELLA, tal y como se hubiera esperado en base a otros resultados<sup>(33)</sup>. Por tanto, la resina GST-SLY1 nos servía como control de la interacción, a la vez que nos permitía determinar si ambas proteínas reconocen idénticos dominios de la proteína RGA.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 34, donde se puede observar una clara interacción de la proteína RGA completa con las resinas GST-SLY1 y PHOR1-St, pero no con el control negativo GST-ARC1, además, la columna GST-SLY1 retuvo los fragmentos F1 y NS, pero no se observó ninguna unión significativa de los fragmentos M5 ó Relig que incluyen el extremo C-terminal de la proteína. La unión a RGA, por otra parte, fue algo menos eficiente que la observada para la fusión PHOR1-St. No se observó ninguna interacción con la resina GST-ARC1 utilizada como control negativo.

Estos resultados demostrarían que tanto PHOR1 como SLY1 unen el dominio DELLA conservado del represor RGA.



**Figura 33. A,** Esquema de la proteína RGA y de los fragmentos NS, M5, F1, del-1 y Relig, utilizados en los ensayos *pull-down*, donde se indican los dominios conservados presentes en cada uno de los fragmentos. **B,** Marcaje de la proteína AtRGA y de sus fragmentos derivados. Se cargó 1 µl de cada una de las reacciones. A la izquierda se muestra la posición de las bandas del marcador de peso molecular. Las proteínas se separaron en un gel de PAA al 10%.



Sorprendentemente, la proteína SLY1 mostró en este ensayo un patrón de reconocimiento idéntico a PHOR1, aún cuando resultados obtenidos en otros laboratorios, utilizando ensayos doble híbrido en levadura, habían demostrado una interacción de esta proteína F-box con la región C-terminal del represor RGA<sup>(33)</sup>.



**Figura 34.** Interacción de distintas regiones de la proteína RGA con las proteínas F-box SLY1 y la proteína U-box PHOR1 en ensayos *pull-down*. Las resinas GST-ARC1, PHOR1-St y GST-SLY1 se incubaron con las proteínas truncadas marcadas con <sup>35</sup>S-metionina. **F1** carece del dominio C-terminal de la proteína. **M5** carece del dominio DELLA. El fragmento **NS** corresponde al extremo N-terminal e incluye el dominio DELLA. **del-1** carece del dominio DELLA y del primer motivo lhr. **Relig** contiene sólo el dominio C-terminal de la proteína.

Estos resultados en efecto son diferentes a los obtenidos por Dill y col., 2004<sup>(33)</sup> ya que indican que el dominio principal de interacción tanto para PHOR1 como la proteína F-box SLY1 es la región conservada DELLA (Fig. 34). Sin embargo, no podemos excluir una interacción mucho más débil con la región C-terminal de la proteína. Cabe resaltar que estos resultados estarían de acuerdo con observaciones más recientes según las cuales el receptor GID1 de GAs se une al dominio DELLA y modifica algún residuo de este dominio, induciendo un cambio de conformación de la proteína que potencia su interacción con la proteína SLY1.

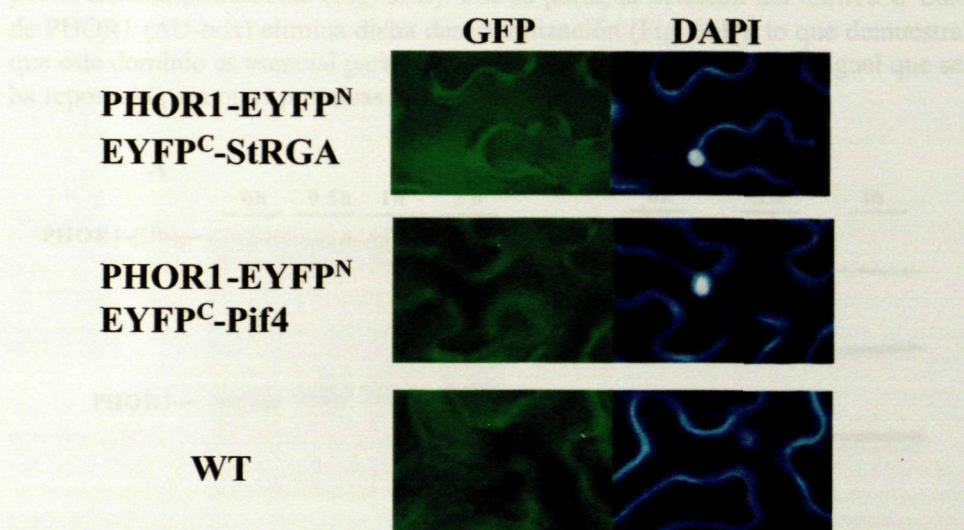
#### 4.3.- PHOR1 INTERACCIONA CON RGA *IN VIVO*.

Para confirmar que la interacción observada en los ensayos *pull-down* ocurre también *in vivo*, se realizaron ensayos de complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC). Estos ensayos se basan en fusionar las proteínas cuya interacción se pretende estudiar a los extremos N-terminal y C-terminal de la proteína fluorescente eYFP, de manera que si las dos proteínas interaccionan *in vivo*, los dos fragmentos de la proteína eYFP se sitúan próximos y reconstituyen una proteína activa cuya fluorescencia se puede detectar en el microscopio<sup>(78, 174)</sup>.

Así, se insertaron las regiones codificantes de las proteínas PHOR1 y RGA en todas sus combinaciones posibles en los vectores de complementación que contienen las regiones N-terminal y C-terminal de la proteína fluorescente eYFP (enhanced Yellow Fluorescent protein, ver materiales y métodos). Estas construcciones se transformaron en la cepa pGV2260 de *Agrobacterium* y se utilizaron para infiltrar hojas de *Nicotiana benthamiana*, conjuntamente con la proteína p19, supresora del silenciamiento viral<sup>(173)</sup>. Las hojas infiltradas se observaron al microscopio y como se muestra en la figura 35, se pudo detectar



fluorescencia en núcleos de hojas que co-expresaban la mitad N-terminal de la proteína eYFP fusionada a PHOR1 (PHOR1-eYFP<sup>N</sup>) y la mitad C-terminal de la proteína eYFP fusionada a RGA (eYFP<sup>C</sup>-RGA). Dicha fluorescencia no se observó cuando la construcción PHOR1-eYFP<sup>N</sup> se co-infiltró con la mitad C-terminal de la proteína eYFP fusionada a una proteína no relacionada (eYFP<sup>C</sup>-PIF4) utilizada como control negativo ó en hojas infiltradas sólo con la proteína p19, lo que demostraría la especificidad de la interacción (Fig. 35). Estos resultados demuestran, por consiguiente, que los represores DELLA y PHOR1, pueden co-localizar en el núcleo y son capaces de interactuar en células de *benthamiana*, corroborando así los resultados anteriormente obtenidos en ensayos *pull-down*.



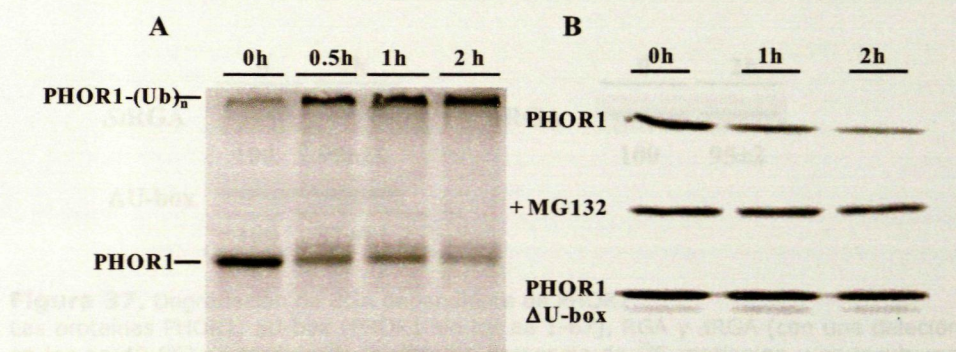
**Figura 35.** Interacción de las proteínas PHOR1 y RGA en células epidérmicas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones BiFC. Imágenes de epifluorescencia (YFP) y correspondientes a la tinción DAPI (DAPI) de las células de la epidermis tras tres días de ser infiltradas con una mezcla 0,7:0,7:1,0 de las *Agrobacterias* transformadas con las construcciones y la proteína supresora de silenciamiento p19. WT corresponde a hojas infiltradas sólo con la proteína p19.

## 5.- ACTIVIDAD E3 LIGASA DE PHOR1.

Las proteínas U-box codifican E3 ligasas de tipo monopéptido, que no requieren de subunidades adicionales para su actividad<sup>(61)</sup>. Estos enzimas, a menudo se auto-ubiquitinan, siendo esta reacción un excelente indicativo de la actividad E3 ligasa asociada. En general, estas proteínas se degradan rápidamente y se ha demostrado que la propia reacción de auto-ubiquitinación es un paso previo para su reconocimiento y posterior degradación por el proteasoma 26S<sup>(91)</sup>. Por otra parte, se ha reportado que los extractos utilizados en la reacción de traducción *in vitro*, como el lisado de reticulocito de conejo (RRL), incluyen las actividades E1, E2 y E3 de ubiquitinación y contienen todos los componentes necesarios para la degradación proteolítica dependiente de Ub<sup>(36, 73, 177)</sup>. Esto, junto a la observación de que las actividades E1 y E2 están altamente conservadas tanto en levaduras, como en animales y plantas, mientras que los enzimas E3 ligasa responsables de proveer la especificidad de sustrato, son específicos de organismo, hace que este sea un sistema ideal para estudiar la actividad E3 ligasa asociada a



una proteína debido a que ésta será capaz de utilizar las actividades E1 y E2 del lisado de reticulocito y ubiquitar sus dianas específicas<sup>(127)</sup>. En base a esta propiedad, pudimos analizar si la proteína PHOR1 era capaz de auto-ubiquitinarse. La proteína se tradujo *in vitro* en presencia de <sup>35</sup>S-metionina y se incubó con una cantidad adicional de RRL a la que se añadió Ub y una cantidad de ATP capaz de aportar la energía necesaria para la reacción de ubiquitinación<sup>(14)</sup>. Como se observa en la figura 36A, la banda correspondiente a la proteína PHOR1 desaparece con el tiempo y su degradación se correlaciona con la acumulación de bandas de alto peso molecular, que corresponden a formas poli-Ub de la proteína (Fig. 36A). La adición MG132, un inhibidor específico del proteasoma 26S, es capaz de inhibir la degradación de la proteína, lo que demuestra que la desestabilización está mediada por el sistema proteasoma (Fig. 36B). Por su parte, la delección del motivo U-box de PHOR1 ( $\Delta$ U-box) elimina dicha desestabilización (Fig. 36B), lo que demuestra que este dominio es esencial para la actividad E3 ligasa de PHOR1, al igual que se ha reportado para otras proteínas U-box<sup>(61, 62)</sup>.



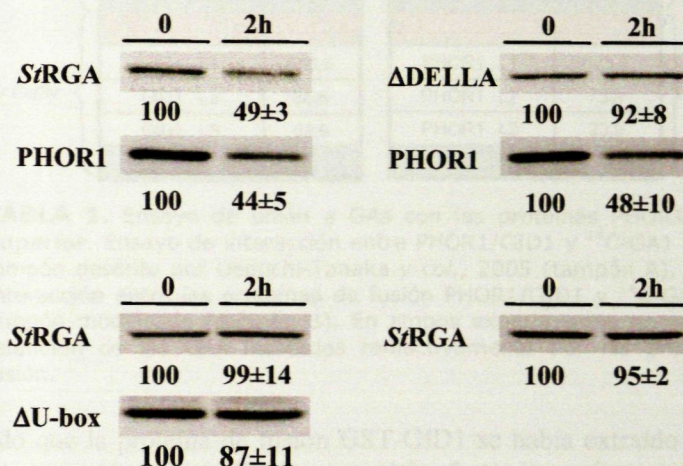
**Figura 36.** Actividad auto-Ub de PHOR1. **(A)** PHOR1 se tradujo *in vitro* y se incubó con RRL, Ub y ATP como se describe en métodos. Se tomaron alícuotas a los tiempos indicados y se mezclaron con TM2X a fin de parar la reacción. La proteína se separó en un gel de PAA al 10% y se detectó mediante autoradiografía. Las bandas de alto peso molecular corresponden a las formas poli-Ub de PHOR1 (PHOR1-(Ub)<sub>n</sub>). **(B)** La reacción de ubiquitinación fue como en (A), excepto que se añadió 100  $\mu$ M MG132 a la reacción (+MG132) o se utilizó una proteína PHOR1 en que se habían delecionado los aa 1-67 ( $\Delta$ U-box).

## 6.- ENSAYO DE DEGRADACIÓN *IN VITRO* DE LAS PROTEÍNAS DELLA.

A fin de comprobar si las proteínas DELLA son dianas de la actividad E3 ligasa de PHOR1 se diseñó un ensayo de ubiquitinación *in vitro* similar al descrito anteriormente pero, en este caso, se tradujeron las dos proteínas PHOR1 y RGA en presencia de <sup>35</sup>S-metionina y se incubó una mezcla de las dos proteínas con Ub, ATP y una cantidad adicional de RRL. Como se muestra en la figura 37, la incubación conjunta de las proteínas PHOR1 y RGA conduce a una degradación de ambas proteínas. Esta degradación está mediada por PHOR1, ya que no se observa en ausencia de PHOR1, ni cuando se incubaba RGA con la forma inactiva de PHOR1, que carece del motivo U-box ( $\Delta$ U-box) (Fig. 37).



Por otra parte, observamos que la desestabilización de RGA depende de la presencia del motivo DELLA, ya que cuando se utiliza una forma truncada de esta proteína, con una delección de 17 aa en dicho motivo, la proteína permanece estable aún en presencia de PHOR1 (Fig. 37). Estos resultados demuestran que RGA es en efecto un sustrato directo de la actividad E3 ligasa de PHOR1 y que la ubiquitinación mediada por PHOR1 de estos represores depende de la presencia de un dominio DELLA intacto, al igual que se había observado *in vivo* en plántulas de *Arabidopsis*<sup>(31)</sup>.



**Figura 37.** Degradación de RGA dependiente de PHOR1.

Las proteínas PHOR1, ΔU-box (PHOR1 sin los aa 1-67), RGA y ΔRGA (con una delección en los aa 43-86) se tradujeron *in vitro* en presencia de <sup>35</sup>S-metionina y se incubaron durante 2 h con Ub y ATP como se indica en métodos. Se añadió RRL hasta una concentración final de 12,5 μL por 25 μL de reacción. Se tomaron alícuotas de 8 μL a las 0 y 2 h y se mezclaron con un volumen igual de TM2X para parar la reacción. Las proteínas se separaron en un gel de PAA al 10% y se detectaron por autoradiografía. Los números mostrados en la parte inferior de cada imagen representan la cantidad relativa de estas proteínas detectadas por cuantificación de la señal radiactiva ± desviación estándar. El experimento se repitió tres veces.

## 7.- INTERACCIÓN DE PHOR1 CON GAs.

La observación que PHOR1 varíe su localización subcelular en respuesta a la aplicación de GAs nos hizo plantearnos si PHOR1 podría unir directamente estas hormonas y funcionar por tanto como un receptor intracelular de GAs. Aunque se conocía que la proteína GID1 funciona como receptor soluble de GAs, ello no descartaba que más de un receptor pueda mediar la respuesta a estas hormonas, por lo que decidimos estudiar si PHOR1 es capaz de unir directamente GAs marcadas radiactivamente. En los ensayos de interacción utilizamos la proteína de fusión PHOR1-St y una construcción correspondiente a GID1 fusionada a GST (GST-GID1), como control positivo de interacción<sup>(170)</sup>. Para la incubación se utilizaron dos tampones y condiciones distintas como se describe en los métodos. Sin embargo, como se muestra en la tabla # 1, no se observó una unión de la hormona en ninguna de las condiciones ensayadas, ni para la proteína PHOR1-St ni tampoco para el receptor de GAs (GST-GID1). La mayoría de <sup>14</sup>C-GA<sub>1</sub> se detectó en el sobrenadante y primer lavado de la resina, pero no se observó que



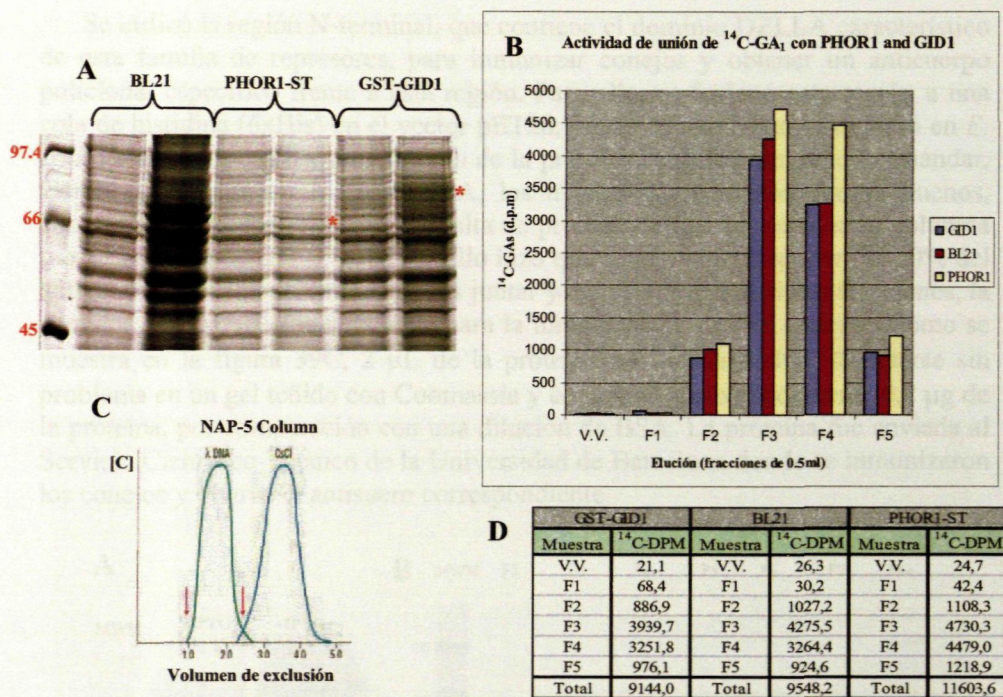
fuera retenida por la proteína unida a la resina, ya que en el contador de centelleo no mostró marcaje significativo.

	Sample	<sup>14</sup> C-CPM		Sample	<sup>14</sup> C-CPM	
<i>Matsuoka Buffer</i>	GID1 SPNT	9.332,7		PHOR1 SPNT	5.019,3	<i>Matsuoka Buffer</i>
	GID1 L1	788,4		PHOR1 L1	582,1	
	GID1 L2	51,4		PHOR1 L2	72,4	
	GID1 L3	28,6		PHOR1 L3	26,0	
	GID1 Res	25,2		PHOR1 Res	26,5	
<i>Our Buffer</i>	GID1 SPNT	8.972,6		PHOR1 SPNT	4.160,1	<i>Our Buffer</i>
	GID1 L1	800,6		PHOR1 L1	623,4	
	GID1 L2	85,6		PHOR1 L2	73,4	
	GID1 L3	28,6		PHOR1 L3	23,9	
	GID1 Res	28,1		PHOR1 Res	18,7	

**TABLA 1.** Ensayo de unión a GAS con las proteínas PHOR1 y GID1. **Superior.** Ensayo de interacción entre PHOR1/GID1 y  $^{14}\text{C}$ -GA1 usando el tampón descrito por Ueguchi-Tanaka y *col.*, 2005 (tampón A). **Inferior.** Interacción entre las proteínas de fusión PHOR1/GID1 y  $^{14}\text{C}$ -GA<sub>1</sub> con un tampón modificado (tampón B). En ambos experimentos no se observa retención de las GAS marcadas radiactivamente por las proteínas de fusión.

Dado que la proteína de fusión GST-GID1 se había extraído en presencia de sarcosil, se pensó que este detergente podría afectar la conformación de la proteína GID1, eliminando así su capacidad de unión de GAs. Por consiguiente, intentamos ensayos alternativos en los que se utilizaron los extractos proteicos crudos de células BL21(DE3)pLysS transformadas con las construcciones PHOR1-St y GST-GID, así como extractos de células no transformadas como control negativo de interacción (Fig. 38A). Estos extractos se incubaron durante una hora a 4°C con  $^{14}\text{C}$ -GA<sub>1</sub> y se separaron a través de columnas NAP-5 (Amersham) a fin de separar la  $^{14}\text{C}$ -GA<sub>1</sub> soluble de la unida a las proteínas GID1 y/o PHOR1 (estas eluyen en un primer pico de la columna). Se recuperaron distintas fracciones de la columna y se midió su radiactividad en un contador de centelleo. Como se observa en la figura 38B y D, no se detectó radiactividad en las primeras fracciones sino que prácticamente todo el marcaje se localizó en las fracciones más tardías, tanto en los extractos correspondientes a las proteínas GID1 y PHOR1, como en los de células no transformadas usadas como control.





**Figura 38.** Ensayo de interacción de las GAs marcadas radiactivamente ( $^{14}\text{C-GA}_1$ ) con los extractos proteicos de células BL21(DE3)pLysS transformadas con las construcciones PHOR1-St y GST-GID1. (A) Gel de PAA al 8% mostrando los niveles de expresión de las proteínas de fusión PHOR1-St, GST-GID1. Se muestra también el extracto crudo usado como control negativo de la interacción. Los asteriscos indican las proteínas de fusión. Se cargaron 20  $\mu\text{L}$  de un sedimento de 1 ml de células resuspendido en 200  $\mu\text{L}$  de TM2X. (B) Gráfica representativa de los niveles de radiactividad en cada una de las fracciones del lavado tras la separación en columnas NAP-5. (C) Gráfica representativa del poder de exclusión de las columnas NAP-5. (D) Tabla correspondiente a los valores de radioactividad detectados en las fracciones de lavado, los cuales se utilizaron para la construcción del gráfico mostrado en B.

Estos resultados demuestran que no se observa una interacción, incluso para la proteína GID1 cuya función en la percepción de GAs ha sido demostrada<sup>(113, 170)</sup>. Ello, indicaba que se requería un trabajo importante en la puesta a punto de los ensayos, por lo que se decidió abandonar estos experimentos.

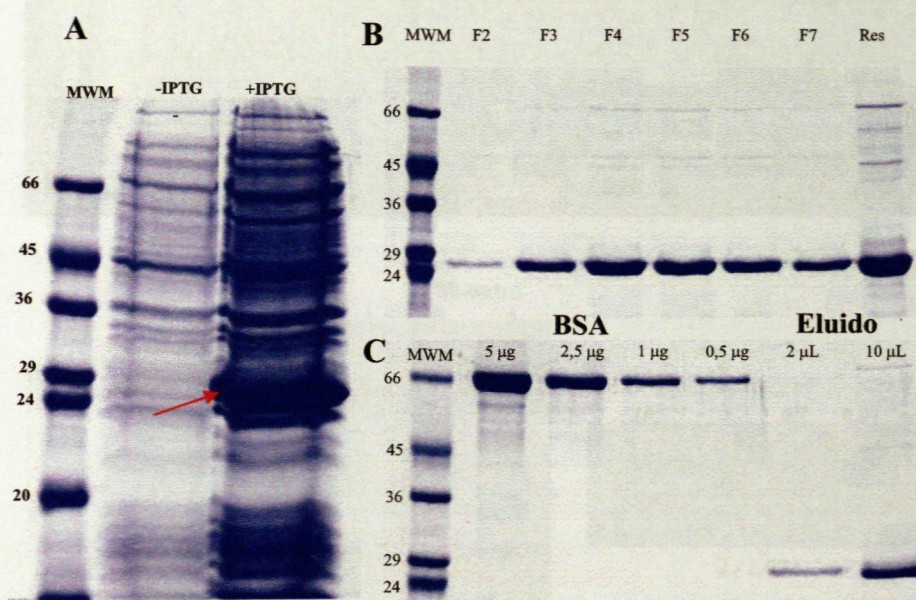
## 8.- PRODUCCIÓN DE UN ANTICUERPO POLICLONAL anti-DELLA.

### 8.1.- PURIFICACIÓN DEL ANTÍGENO UTILIZADO PARA LA PRODUCCIÓN DEL ANTICUERPO.

Puesto que habíamos demostrado que PHOR1 era capaz de ubiquitinar las proteínas DELLA *in vitro*, marcando su degradación por el sistema proteasoma, el disponer de un anticuerpo específico capaz de reconocer estos represores era importante para nuestro trabajo, ya que nos permitiría estudiar la estabilidad *in vivo* de estas proteínas en función de los niveles de expresión de PHOR1.



Se utilizó la región N-terminal, que contiene el dominio DELLA característico de esta familia de represores, para inmunizar conejos y obtener un anticuerpo policlonal específico frente a esta región. Para ello, se fusionó esta región a una cola de histidina (6xHis) en el vector pET28, y esta construcción se expresó en *E. coli*. Para la inducción y purificación de la proteína se utilizó un método estándar. Como se muestra en la figura 39A, los niveles de inducción fueron buenos, aunque una cantidad relativamente alta de proteína seguía retenida en la columna tras eluir con imidazol (Fig. 39B). Ello hizo que se perdiera alrededor del 50% del antígeno purificado pero aún así, tras juntar y concentrar las distintas fracciones, la cantidad recuperada fue suficiente para la inmunización de dos conejos. Como se muestra en la figura 39C, 2  $\mu\text{L}$  de la proteína purificada podían detectarse sin problema en un gel teñido con Coomassie y contenían aproximadamente 0,2  $\mu\text{g}$  de la proteína, por comparación con una dilución de BSA. La proteína fue enviada al Servicio Científico-Técnico de la Universidad de Barcelona donde se inmunizaron los conejos y obtuvo el antisuero correspondiente.

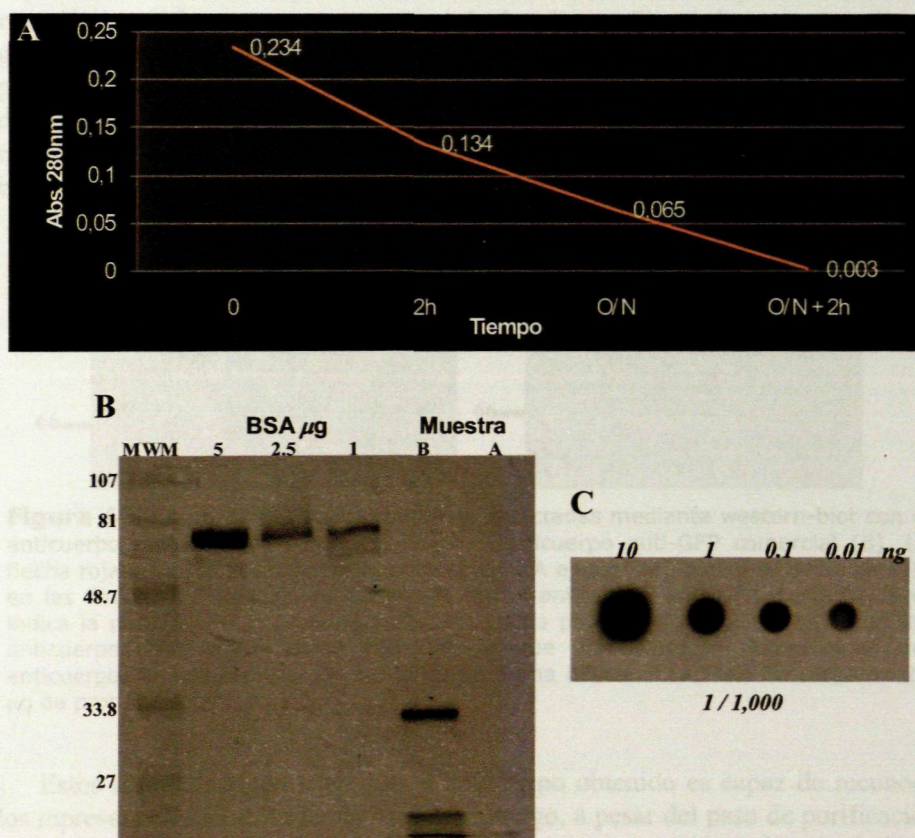


**Figura 39.** Purificación de la proteína de fusión DELLA-6xHis para la producción del anticuerpo anti-DELLA. **(A)** Inducción de la proteína en células de *E. coli* transformadas con la construcción DELLA en el vector pET28a(+). Las células se indujeron mediante adición de 1  $\mu\text{M}$  de IPTG y 2 h adicionales de incubación. La flecha indica la posición de la proteína de fusión DELLA-6xHis. **(B)** Gel de PAA donde se separaron las fracciones eluidas con una solución 300  $\mu\text{M}$  de imidazol. En Res, se cargaron 10  $\mu\text{L}$  de resina (de un total de 500  $\mu\text{L}$ ) después de la elución **(C)** Cuantificación de las fracciones eluidas. Las fracciones se juntaron y concentraron, y se cargó 2 y 10  $\mu\text{L}$  de la proteína purificada (el total era de 1 ml), junto a concentraciones decrecientes de la proteína BSA.



## 8.2.- PURIFICACIÓN Y TITULACIÓN DEL ANTICUERPO.

Dado que en ensayos western blot preliminares se observó que el antisuero mostraba una reacción cruzada frente a otras proteínas, se decidió purificarlo a través de columnas en las que habíamos unido el antígeno, a fin de mejorar su especificidad. Para ello, se acopló covalentemente el fragmento N-terminal DELLA que se había utilizado para generar el antisuero a una resina de *Sepharose* activada con BrCN. Como se observa en la Fig. 40A y B, una incubación de toda la noche (ON) a 4°C más 2 h adicionales a temperatura ambiente (RT) fue suficiente para acoplar covalentemente prácticamente el 100% de la proteína antigénica a la resina de BrCN.



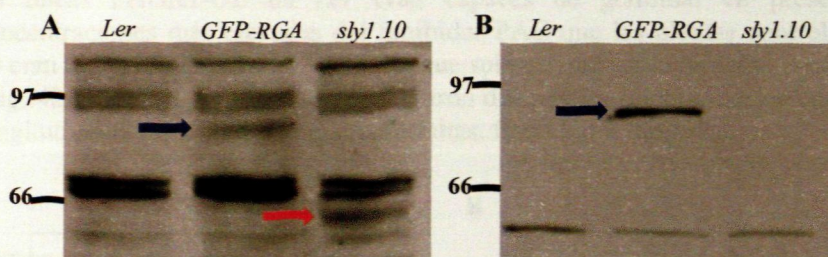
**Figura 40. A,** Acoplamiento de la proteína antigénica a la resina de BrCN. Tras 2 h de incubación a temperatura ambiente (RT), la cantidad de proteína en el sobrenadante se redujo casi a la mitad. Tras una incubación de toda la noche a 4°C y 2 h a RT se capturó casi el 100% de la proteína. Análisis Bradford de la proteína no capturada. **B,** Presencia de la proteína antigénica en el sobrenadante antes (B) y después (A) del acoplamiento a la resina de BrCN, se separaron 10  $\mu$ l de cada una de las fracciones en un gel de PAA y se comparó con concentraciones conocidas de BSA. **C,** Dot blot del anticuerpo purificado utilizando la proteína antigénica a las concentraciones indicadas. Una dilución 1/1000 del anticuerpo purificado es capaz de detectar del orden de picogramos de la proteína.

Una vez acoplada la proteína a la resina, se pasó el antisuero y tras varios lavados, los anticuerpos unidos se eluyeron con glicina a pH 2.8 y se titularon mediante ensayo *dot blot*. Como se observa en la figura 40C, el anticuerpo



purificado, a una dilución 1/1000, era capaz de detectar hasta 0,01 ng de la proteína purificada.

A fin de confirmar que el anticuerpo obtenido podía ser utilizado para la detección de los represores DELLA en extractos de plantas, se prepararon extractos de plantas silvestres *Ler*, de las líneas *RGA::GFP-RGA*, y de las líneas mutantes *sly1-10*, que al presentar una mutación en la proteína F-box *SLY1*, acumulan niveles elevados de las proteínas DELLA. Dichos extractos se separaron en geles de PAA, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se detectaron mediante ECL western blot con el anticuerpo anti-DELLA obtenido y con un anticuerpo comercial anti-GFP. Como se observa en la figura 41, el anticuerpo es capaz de detectar los represores DELLA en estos extractos pero muestra aún reacción cruzada con otras proteínas de la planta. Sin embargo, en geles en gradiente se consigue detectar las proteínas DELLA separadas de las otras proteínas con una inmunoreacción cruzada. El anticuerpo anti-GFP, por su parte, detectó en los extractos de plantas GFP-RGA una banda de idéntico peso molecular a la detectada con el anticuerpo purificado, lo que demuestra que esta banda corresponde en efecto a los represores DELLA.



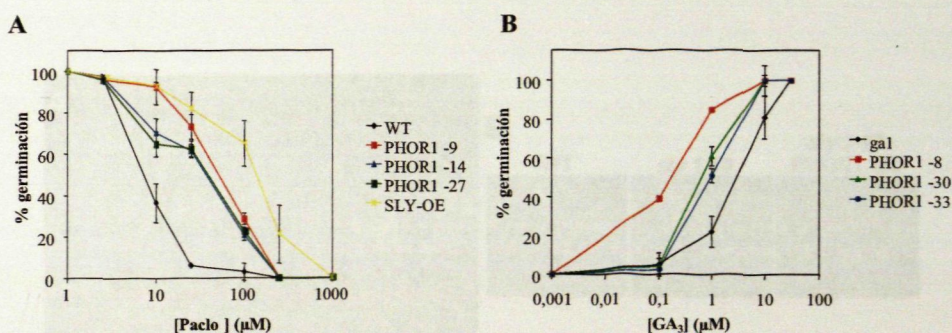
**Figura 41.** Comparación de las proteínas detectadas mediante western-blot con el anticuerpo anti-DELLA purificado (A) y un anticuerpo anti-GFP comercial (B). La flecha roja indica la posición de la proteína DELLA endógena, la cuál se acumula sólo en las líneas *sly1-10* y no es detectada con el anticuerpo anti-GFP. La flecha azul indica la posición de la proteína RGA-GFP. Dicha proteína se detecta tanto con los anticuerpos anti-DELLA como anti-GFP, lo que demuestra la especificidad del anticuerpo. Ambos anticuerpos se utilizaron a una dilución 1/1000. Se cargaron 25 µg de proteína total.

Estos resultados indicarían que el anticuerpo obtenido es capaz de reconocer los represores DELLA de la planta. Sin embargo, a pesar del paso de purificación, no se consiguió eliminar la reacción cruzada con otras proteínas, lo que limita su posible utilización. Si bien hemos demostrado su utilidad para ensayos western-blot, en combinación con geles en gradiente para separar las proteínas con una reacción cruzada, no es adecuado para ensayos de inmunoprecipitación ó inmunolocalización debido al elevado ruido de fondo obtenido. A este respecto cabe señalar que resultados similares fueron también obtenidos por otros grupos y parecen obedecer a características inherentes a la baja antigenicidad de estas proteínas.



## 9.- FENOTIPOS CAUSADOS POR LA SOBRE-EXPRESIÓN DE PHOR1.

Para comprobar la acción biológica de PHOR1 se obtuvieron líneas transgénicas *Arabidopsis* que sobre-expresaban la proteína (PHOR1-OE) bajo control del promotor constitutivo 35S. Dicha construcción se introdujo en líneas silvestres de *Arabidopsis* del ecotipo *Landsberg erecta* (*Ler*) y también en el mutante *gal-3* deficiente en la biosíntesis de GAs. Al comparar los fenotipos de las líneas transgénicas obtenidas con las respectivas líneas control no se observó ningún fenotipo evidente a excepción de que la sobre-expresión de PHOR1 parecía recuperar parcialmente la germinación defectiva de las semillas mutantes *gal-3*. Las semillas de estos mutantes no germinan a no ser que sean suplementadas con GA<sub>3</sub> en el medio de germinación, y en cambio un porcentaje muy reducido de las semillas PHOR1-OE x *gal-3* era capaz de germinar sin ningún tratamiento. Ello podía ser indicativo de una potenciación de la respuesta a estas hormonas, y en efecto, pudimos observar que las semillas PHOR1-OE x *gal-3* requieren una concentración 10 veces menor de GA<sub>3</sub> en comparación a las semillas *gal-3*, para inducir su germinación (Fig. 42B). A su vez, las semillas de las líneas PHOR1-OE en *Ler* eran capaces de germinar en presencia de concentraciones más elevadas del inhibidor PAC que las plantas control, si bien no eran tan resistentes como las líneas que sobre-expresan la proteína F-box SLY1 (Fig. 42A). Por lo demás, no se observaron diferencias importantes en cuanto a la longitud final del tallo de las plantas adultas, floración o fertilidad.



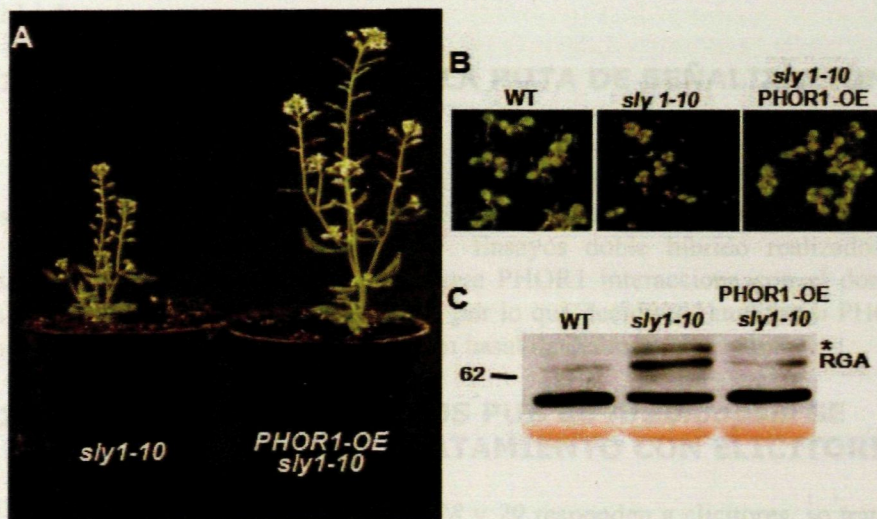
**Figura 42.** Fenotipo de germinación de las semillas PHOR1-OE. **(A)** Germinación de las semillas en presencia del inhibidor PAC. Las semillas se sembraron sobre placas conteniendo concentraciones crecientes de PAC tal y como se indica en la figura y se analizó el porcentaje de semillas germinadas. **(B)** La semillas PHOR1-OE x *gal-3* requieren concentraciones menores GAs para germinar que las semillas *gal-3*. Las semillas se sembraron sobre placas conteniendo concentraciones crecientes de GA<sub>3</sub> y se analizó el ratio de germinación al 7º día.

Estos resultados, estarían en parte de acuerdo con una función positiva de la proteína PHOR1 en la ruta de señalización de GAs, aunque indicarían una función de esta proteína en una rama específica de señalización, diferente de la responsable del control de la elongación celular ó la floración.



## 10.- PHOR1 RECUPERA PARCIALMENTE EL FENOTIPO ENANO DEL MUTANTE *sly1-10*.

Los fenotipos observados en las plantas transgénicas PHOR1-OE podrían atribuirse a una función de PHOR1 en la degradación de los represores DELLA. En ese caso, esperaríamos que la sobre-expresión de PHOR1 recupere el fenotipo enano de los mutantes *sly1-10* (estos mutantes acumulan cantidades más elevadas de los represores DELLA debido a la mutación en el gen F-box SLY1). Para comprobar si esto ocurría, se cruzaron las líneas transgénicas PHOR1-OE con el mutante *sly1-10* para generar líneas PHOR1-OE x *sly1-10*, homocigotas para la mutación y el transgén. En la figura 43 se muestra el fenotipo de estas plantas crecidas en tierra, donde se observa que la sobre-expresión de PHOR1 complementa sólo en parte el fenotipo enano de este mutante. Dicha complementación afecta la elongación del tallo, pero no la fertilidad de las plantas, dado que en ambas líneas las silicuas son pequeñas y contienen un número reducido de semillas (Fig. 43A). PHOR1, por otra parte, si es capaz de recuperar el fenotipo de germinación de los mutantes *sly1-10*. En el experimento mostrado en la figura 43B, por ejemplo, se observa que mientras que sólo el 50% de las semillas *sly1-10* germinan en medio MS, el 100% de semillas PHOR1-OE x *sly1-10* son capaces de germinar en este medio. Estas semillas germinan también antes que las *sly1-10* y casi al mismo tiempo que las líneas silvestres. La adición de 1  $\mu$ M de 24-epibrassinolide al medio, por otra parte, mejoró el porcentaje de germinación de las semillas *sly1-10*, confirmando que los defectos observados no están relacionados con un problema de viabilidad de estas semillas.



**Figura 43.** La sobre-expresión de PHOR1 recupera parcialmente el fenotipo enano del mutante *sly1-10*. **(A)** Fenotipo de plantas adultas *sly1-10* y PHOR1-OE x *sly1-10* de 45 días **(B)** Recuperación de los defectos de germinación de los mutantes *sly1-10*. **(C)** Detección de los niveles de acumulación de la proteína RGA en plantas silvestres, *sly1-10* y PHOR1 x *sly1-10*. La sobre-expresión de PHOR1 reduce los niveles de acumulación de la proteínas RGA. El asterisco señala una banda de migración ligeramente más lenta, la cual podría corresponder a la forma fosforilada de RGA. Se muestra la tinción Ponceau de la membrana como control de carga de las muestras. Se cargaron 25  $\mu$ g de proteína total.



A fin de confirmar que la recuperación del fenotipo mutante *sly1-10* iba acompañada de una reducción en los niveles de acumulación de los represores DELLA, se obtuvieron extractos totales de las líneas *Ler* (WT), *sly1-10* y PHOR1-OE *sly1.10*, los cuales se analizaron mediante western blot con el anticuerpo policlonal anti-DELLA generado anteriormente. En la figura 44C se puede observar que los niveles de las proteínas DELLA son en efecto menores en las líneas PHOR1-OE x *sly1-10* que en los mutantes *sly1-10*, lo que indicaría que la acumulación de las proteínas DELLA se ve comprometida por la sobre-expresión de PHOR1. Estos resultados demuestran que PHOR1 es capaz de degradar *in vivo* las proteínas DELLA, a través de una vía independiente del complejo SCF<sup>SLY1</sup> (Fig. 43C), de acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos de degradación *in vitro*.

Así, los resultados de los estudios de sobre-expresión de la proteína PHOR1 en diferentes fondos genéticos demostraron que PHOR1 es capaz de inducir una disminución en los niveles endógenos de los represores DELLA y aliviar algunos de los fenotipos causados por las mutaciones *sly1-10* y *gal-3* (especialmente los relacionados con la germinación). Sin embargo, dicha degradación no ocurriría a niveles suficientes como para revertir de manera completa el fenotipo enano de estos mutantes. En el laboratorio hemos aislado a su vez mutantes en los genes *PUB27* y *PUB28* de *Arabidopsis*, y generado el doble mutante *pub27/pub28*. Ninguno de estos mutantes presenta un fenotipo enano o una germinación deficiente, lo que nos llevó a postular que PHOR1 participa sólo en una vía específica de degradación de estos represores (degrada sólo algunos miembros de la familia génica ó sólo es activo en algunas células ó tejidos) o bien necesita ser activado por alguna señal exógena adicional para desestabilizar las proteínas DELLA.

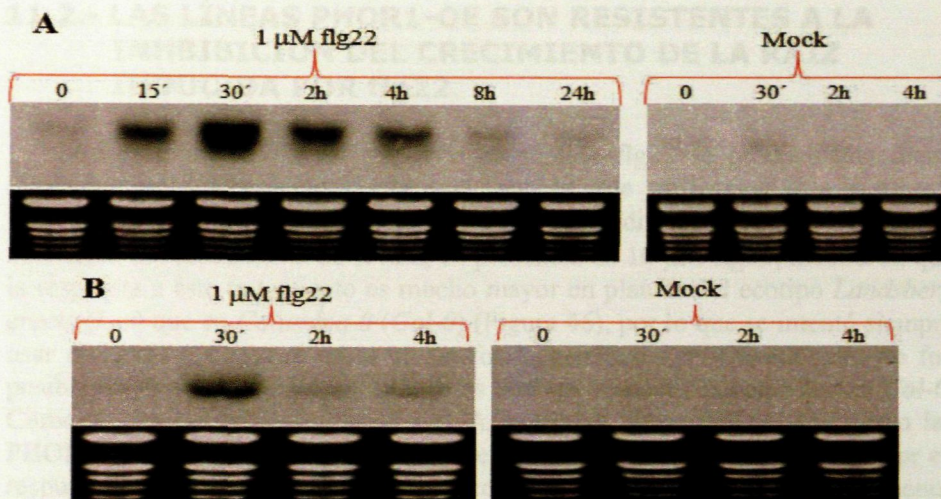
## **11.- FUNCIÓN DE PHOR1 EN LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE DEFENSA.**

En una búsqueda en las bases de datos *genevestigator* y TAIR se observó que los genes *PUB27*, *28* y *29* de *Arabidopsis* eran rápidamente inducidos en respuesta a elicitores fúngicos y bacterianos<sup>(193)</sup>. Ensayos doble híbrido realizados en nuestro laboratorio mostraron también que PHOR1 interacciona con el dominio quinasa del receptor FLS2 de flagelina<sup>4</sup>, por lo que decidimos analizar si PHOR1 podría tener alguna función en la reacción basal de defensa de la planta.

### **11.1.- LOS GENES ORTÓLOGOS PUB de *Arabidopsis* SE INDUCEN TRAS EL TRATAMIENTO CON ELICITORES.**

Para estudiar si los genes *PUB27*, *28* y *29* responden a elicitores, se trataron plantas silvestres *Ler* con el péptido flg22 (análogo sintético de la flagelina bacteriana) y se estudió los niveles expresión de estos mensajeros mediante northern blot. En la Fig. 44A se muestra que el mRNA *PUB28* se induce rápidamente en respuesta a flagelina para alcanzar niveles máximos a los 30 min de tratamiento. Luego disminuye de manera paulatina, volviendo a su nivel basal a las 24 h de incubación.





**Figura 44.** Activación del gen *AtPUB28* en respuesta a flg22. En **A**, se muestra la inducción dependiente de flg22 del transcrito *AtPUB28* de *Arabidopsis*. Se trató plántulas de 10 días con una solución que contenía 1  $\mu$ M de flg22 disuelta en medio de germinación (GM/Mock). En **B**, comprobación de la activación de la respuesta inmune por el tratamiento con flg22. Se usó el gen *AtLOX4*, entre otros, como reportero de la respuesta inducida por el elicitor. Se tomaron muestras a los tiempos indicados y se extrajo RNA total, el cuál se hibridó con las sondas correspondientes a los genes *AtPUB28* y *AtLOX4*. En la parte inferior de la figura se muestra la tinción con BrEt del gel del RNA. Se cargaron 15  $\mu$ g de RNA total de cada una de las muestras.

Dicha activación, no se observa en plántulas de *Arabidopsis* tratadas únicamente con el tampón de disolución (*mock*, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ) ni en líneas de *Arabidopsis* del ecotipo *Wassilewskija*, con una mutación natural en el gen *FLS2*<sup>4</sup>. Los otros dos miembros de la familia, *PUB27* y *29*, mostraron un patrón de activación muy semejante al obtenido para *PUB28*<sup>4</sup>. Asimismo, la aplicación del elicitor quitina produjo resultados similares, lo que indica que estos genes se inducen en respuesta a los dos elicitores<sup>(104)</sup>.

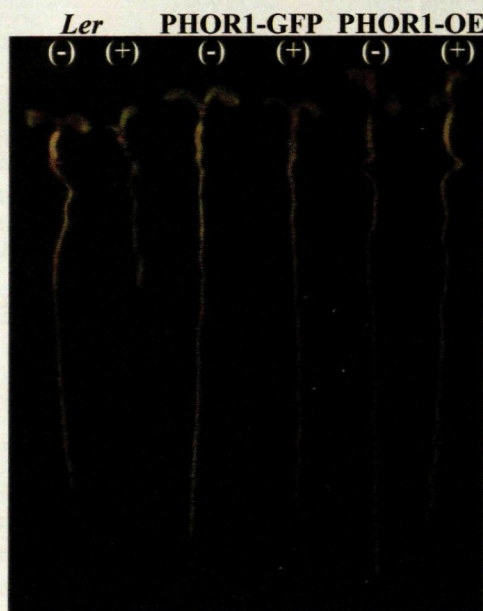
Como control positivo del tratamiento con flg22, los mismos filtros se hibridaron con una sonda correspondiente al gen *AtLOX4* (número de acceso *At1g72520*), figura 44B, amablemente cedida por la Dra. Carmen Castresana y previamente utilizada por otros grupos como marcador temprano de la respuesta a flagelina. Estos resultados sugerían que los ortólogos PHOR1 de *Arabidopsis* (*PUB 27, 28 y 29*) podrían estar involucrados en la señalización por flagelina, modulando los cambios en el balance hormonal que se inducen durante la respuesta inmune de defensa.

<sup>4</sup> Datos obtenidos en el laboratorio.



### 11.2.- LAS LÍNEAS PHOR1-OE SON RESISTENTES A LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE LA RAÍZ INDUCIDA POR flg22.

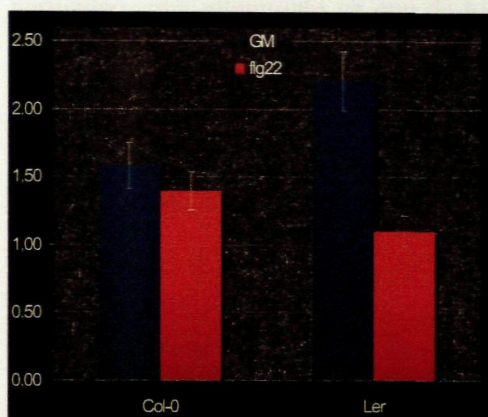
Se ha reportado que en respuesta al péptido flg22 se produce una fuerte inhibición del crecimiento de la raíz, por lo que utilizamos esta respuesta fenotípica para estudiar la sensibilidad a flg22 de las diferentes líneas. Ensayos de inhibición del crecimiento de la raíz, en presencia de 10  $\mu$ M flg22, mostraron que la respuesta a este tratamiento es mucho mayor en plantas del ecotipo *Landsberg erecta* (*Ler*) que en *Columbia-0* (*Col-0*) (Figura 46), por lo que se intentó siempre usar mutantes y construcciones en un fondo genético *Ler*. Cuando esto no fue posible, se comparó las líneas estudiadas con sus respectivos controles en *Col-0*. Como se observa en la figura 45 y 47A, tanto las líneas PHOR1-OE como las PHOR1-GFP mostraron una inhibición del crecimiento de la raíz mucho menor en respuesta a flg22 que las líneas *Ler* control, siendo por tanto mucho menos sensibles al elicitor. Estas líneas mostraron también ser algo menos sensibles al inhibidor PAC, lo que estaría de acuerdo con nuestros resultados previos. Sin embargo, la resistencia a PAC fue menor que la observada para el elicitor flg22 y también claramente inferior a la observada en las líneas mutantes en los genes DELLA ó en las líneas SLY1-OE (ver más adelante).



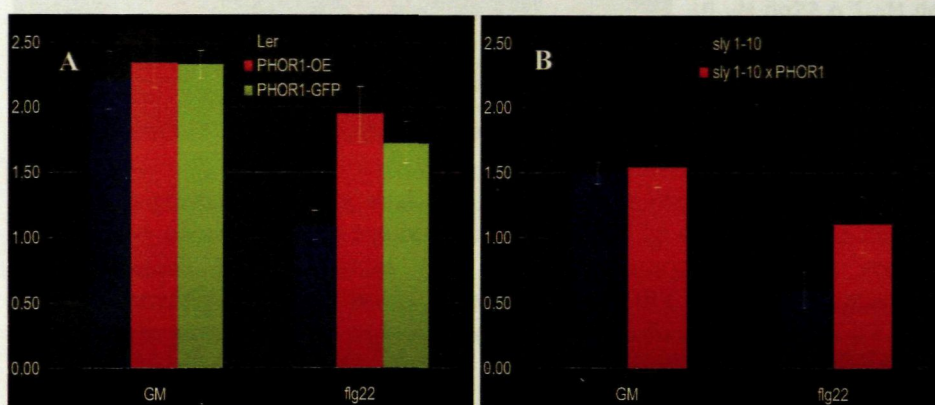
**Figura 45.** Fenotipos obtenidos tras el tratamiento con flg22 de las líneas PHOR1-OE y PHOR1-GFP. En tanto que *Ler* muestra una inhibición clara del crecimiento de la raíz, las líneas PHOR1 son mucho menos sensibles a este tratamiento. (+) con tratamiento; (-) sin tratamiento. Las plantas se crecieron en presencia de 10  $\mu$ M de flg22 en el medio de cultivo. Las semillas se estratificaron en medio GM y tras germinar se transfirieron a nuevas placas con los correspondientes medios.

Como se observa en la Fig. 47B, la sobre-expresión de PHOR1 es capaz también de conferir insensibilidad a flg22 en el fondo genético *sly1-10*, ya que se observó una respuesta de inhibición mucho menor en las líneas PHOR1-OE x *sly1-10* que en el mutante *sly1-10*. Ello indicaría que PHOR1 reprime la respuesta de inhibición del crecimiento de la raíz inducida por flagelina y que por tanto ejercería una función negativa en la ruta de señalización de este elicitor. Dicha función, por otra parte, es independiente de la proteína F-box SLY1, ya que tanto las líneas PHOR1-OE como PHOR1-OE x *sly1-10* son igualmente insensibles al tratamiento con el elicitor (Figs. 45 y 47B).





**Figura 46.** Fenotipo de inhibición del crecimiento de la raíz inducida por flg22 en los ecotipos *Ler* y *Col*. Se observa que *Ler* es más susceptible que *Col-0*. Las plantas se crecieron en presencia de 10  $\mu$ M de flg22 en el medio de cultivo



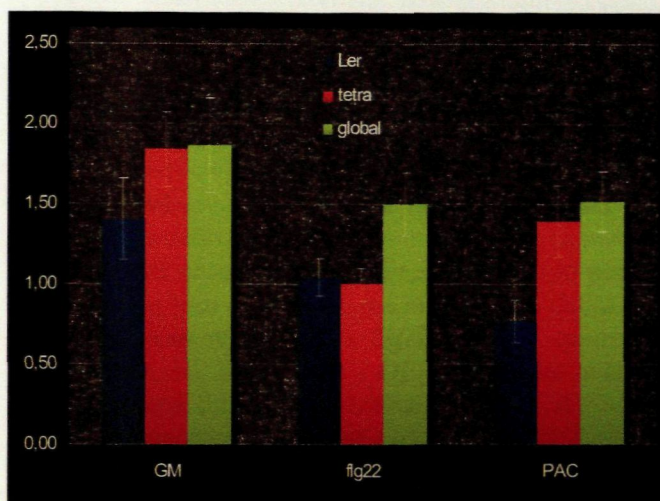
**Figura 47. A**, Sensibilidad a flg22 de las líneas PHOR1-OE y PHOR1-GFP comparadas con su control silvestre *Ler* y **B**, sensibilidad a flg22 de las líneas *sly1-10* y PHOR1-OE x *sly1-10*. Las plantas se crecieron en presencia de 10  $\mu$ M flg22 en el medio de cultivo.

### 11.3.- LAS PROTEÍNAS DELLA MEDIAN LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE LA RAÍZ TRAS EL TRATAMIENTO CON flg22.

Ya que habíamos observado que PHOR1 es capaz de ubiquitinar los represores DELLA, nos planteamos estudiar si la menor respuesta a flg22 de las líneas PHOR1-OE era DELLA dependiente. En tal caso esperaríamos que las líneas con una pérdida de función de los genes DELLA mostraran también una respuesta reducida a este elicitor. Se empleó el mutante *global* con una mutación en los cinco genes DELLA (*rga-24/gai-t6/rgl1-1/rgl2-1/rgl3-1* ó *global*) y el mutante *tetra* con una pérdida de función en 4 de estos genes pero que conserva una copia activa del gen *RGL3* (*rga-24/gai-t6/rgl1-1/rgl2-1*), ambos en el fondo *Ler*. Como se muestra en la Fig. 49, ambos mutantes son menos sensibles a PAC, pero sin embargo muestran una respuesta diferente a flg22. En tanto que el mutante *global* es mucho menos sensible a flg22 que la línea control *Ler*, el mutante *tetra* muestra una respuesta similar al control (Fig. 48 y 51). Ello indicaría que las proteínas DELLA están implicadas en la ruta de señalización de flagelina ya que en ausencia de estos represores no se observa una inhibición del crecimiento de la raíz. A su vez, la presencia de una copia activa de *RGL3* es suficiente para restablecer la respuesta al elicitor, lo que indicaría una función de este represor en la ruta de señalización de flg22. Esta observación es

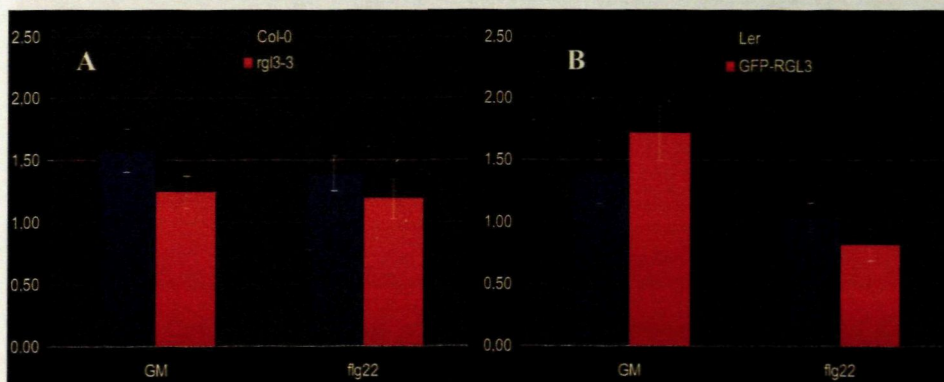


particularmente interesante ya que de todos los miembros DELLA, RGL3 es el único cuya función se desconoce.



**Figura 48.** Fenotipo tras el tratamiento con flg22 de las líneas mutantes *global* y *tetra*. Longitud de las raíces de plantas silvestres *Ler* y las líneas mutantes sin tratar (GM), tratadas con flagelina (flg22) ó con paclobutrazol (PAC). Las plantas se crecieron durante 4 días en presencia de 10  $\mu$ M flg22 o 1  $\mu$ M de PAC. Las semillas se estratificaron en medio GM y se transfirieron a placas con los diferentes medios.

Para confirmar este dato, analizamos las líneas mutantes *rgl3* (*rgl3-3*) en el fondo *Col-0*, observando que son resistentes a flg22 (Fig. 49A y 51). Las líneas de sobre-expresión GFP-RGL3 en *Ler*, por el contrario, mostraron ser más susceptibles a flg22 que las líneas silvestres (Fig. 49B), lo que confirmaría una función de la proteína RGL3 en la ruta de señalización de este elicitor.



**Figura 49.** Fenotipo tras el tratamiento con flg22 del mutante *rgl3-3* y la línea de sobre-expresión RGL3-GFP. **A.** El mutante *rgl3-3* sin tratar (GM) ó tratado con flg22 (flg22) se compara con la línea silvestre (*Col-0*) crecida en las mismas condiciones. **B.** La línea GFP-RGL3 sin tratar (GM) ó tratada con flg22 (flg22) se compara con el control *Ler*. Las plantas se crecieron durante 4 días en presencia de 10  $\mu$ M flg22. Las semillas se estratificaron en medio GM y se transfirieron a placas con los diferentes medios.

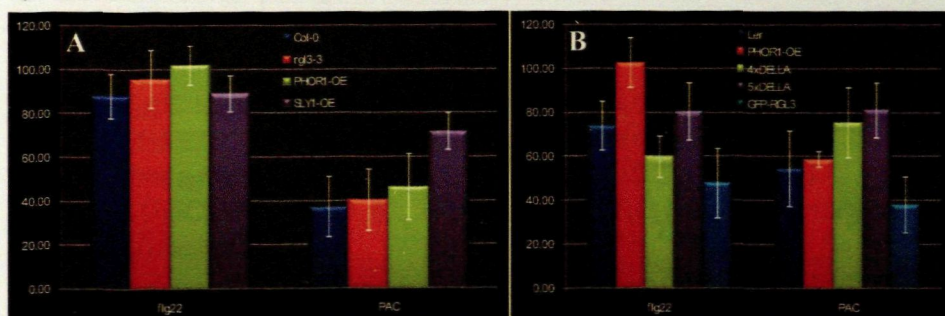
Estos resultados demostrarían una función positiva del represor RGL3 en la respuesta al elicitor flagelina, mientras que PHOR1 por el contrario regularía negativamente dicha respuesta. Por tanto, es relativamente lógico concluir que PHOR1 regula negativamente esta respuesta señalizando la degradación de RGL3. Dicha hipótesis estaría de acuerdo con la observación que PHOR1 es capaz de señalizar la degradación de las proteínas DELLA *in vivo* y explicaría la falta de



recuperación del fenotipo de crecimiento de los mutantes *gal-3* y *sly1-10*, ya que su función estaría más relacionada con defensa que con elongación celular.

La longitud de las raíces se midió con el programa *ImageJ* (se midieron 10 plántulas por línea y tratamiento) y los promedios de estas medidas se utilizaron para calcular los índices de susceptibilidad a los distintos tratamientos. En la figura 50A y B se representa la sensibilidad relativa a flg22 y PAC, de todas las líneas ensayadas, agrupadas según su ecotipo. Se calculó para ello el porcentaje de inhibición del crecimiento de la raíz en respuesta a los distintos tratamientos, respecto al tamaño de la raíz de la misma línea en medio GM. En el fondo *Col-0* la baja respuesta observada en las líneas control no permite establecer conclusiones definitivas, si bien se observa que la tendencia de las líneas PHOR-OE y *rgl3-3* es claramente más resistentes a flg22 que los controles (Fig. 50A). Se observa también que las líneas SLY1-OE son mucho más resistentes a PAC que al tratamiento con flg22 (en presencia de este elicitor se observó un acortamiento de la raíz prácticamente igual al observado para *Col-0*). Ello indicaría que tanto PHOR1 como SLY1 estarían implicadas en la degradación de los represores DELLA pero que mientras que SLY1 mediaría el crecimiento celular en respuesta a GAs, PHOR1 podría estar implicada en una vía de degradación más específica, activada en respuesta a elicitores patogénicos como flg22 (Fig. 50A y 51).

En el fondo *Ler* la respuesta a flg22 es mucho mayor y se observa una clara resistencia de las líneas PHOR-OE y *global*, así como una respuesta exagerada de los mutantes *tetra* y la línea GFP-RGL3 (Fig. 50B).



**Figura 50.** Comparación de los efectos del tratamiento con flg22 y PAC en las distintas líneas mutantes y de sobre-expresión. Se muestra por separado las líneas en el fondo *Col-0* y *Ler*. **A**, el mutante *rgl3-3* tratado con 10  $\mu$ M de flg22 ó 1  $\mu$ M de PAC se compara con el control *Col-0* y la línea PHOR1-OE crecidos en las mismas condiciones. **B**, la línea GFP-RGL3 tratada con flg22 ó PAC se compara con los mutantes *tetra* y *global*, el control *Ler* y la línea PHOR1-OE, crecidas en las mismas condiciones. Los datos se representan como porcentaje de la longitud de las raíces de las distintas líneas en medio GM.





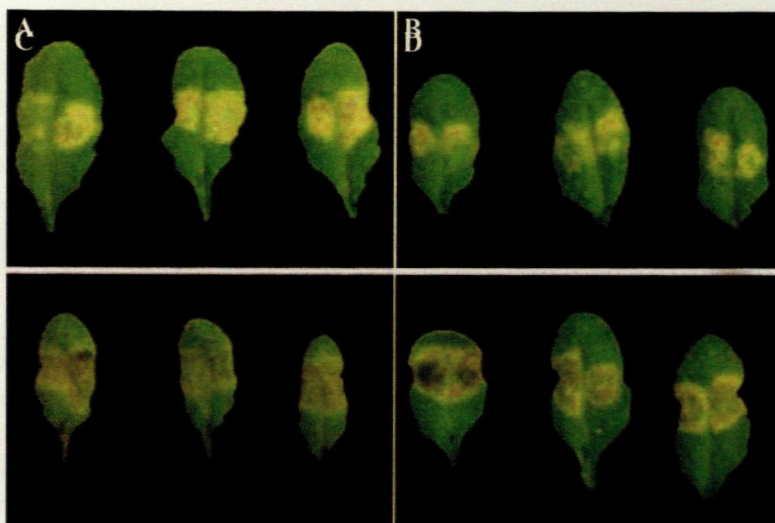
**Figura 51.** Fenotipos tras el tratamiento con flg22 de las líneas SLY1-OE y los mutantes *global*, *tetra* y *rgl3-3*. **A**, Las líneas de sobre-expresión de SLY1 (SLY1-OE) y los mutantes *rgl3-3* sin tratar (-) y tratadas (+) con flg22 se comparan con las correspondientes líneas silvestres (*Col-0*) crecidas en las mismas condiciones. **B**, Las líneas mutantes para los 5 genes DELLA, *global* y líneas *tetra* sin tratar (-) y tratadas (+) con flg22 se comparan con el control *Ler*. Las plantas se crecieron durante 4 días en presencia de 10  $\mu$ M flg22. Las semillas se estratificaron en medio GM y se transfirieron a placas con los diferentes medios.

#### 11.4.- LAS LÍNEAS PHOR1-OE SON MÁS RESISTENTES A INFECCIONES POR EL PATÓGENO BIÓTROFO *Pseudomonas syringae* (PstDC3000) Y MÁS SUSCEPTIBLES AL HONGO NECRÓTROFO *Botrytis cinerea*.

Para evaluar si PHOR1 tiene una función reguladora durante la reacción de respuesta a patógenos, se infectaron plantas PHOR-OE (en el fondo *Col-0*), plantas silvestres *Col-0* y el doble mutante *pub27/pub28* con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 y se analizó la respuesta de defensa tras 48 h de la inoculación. Como se muestra en la figura 52, las líneas que sobre-expresan PHOR1 son más resistentes a la infección por *PstDC3000* que las líneas control (Figs.52A y B) y muestran en las zonas inoculadas un menor grado de clorosis que éstas. Por el contrario, las líneas mutantes *pub27/pub28* muestran una respuesta hipersensible al patógeno caracterizada por la aparición de lesiones necróticas similares ó incluso más intensas que las observadas en el mutante *sid1*, que al estar bloqueado en la síntesis de SA es incapaz de generar una respuesta de defensa adecuada, siendo por tanto más sensible a infecciones por este patógeno biótrofo (Fig. 52C y D).

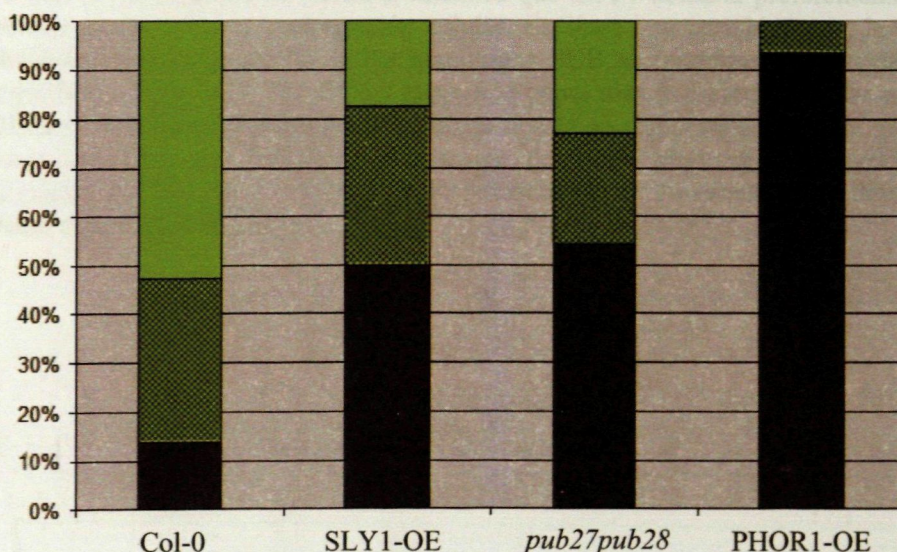
En este caso, se observaron un comportamiento opuesto (más resistente) de la línea transgénica *pub1/col-0*, como se había observado en las infecciones con el hongo *PstDC3000*. La línea *pub1/pub28* mostró también una respuesta hipersensible a este hongo, similar a la observada en las líneas SLY1-OE (Fig. 51).





**Figura 52.** Respuesta a la infección por *PstDC3000* observada en las plantas PHOR1-OE, *sid1* y *pub27pub28*. **A**, líneas silvestres Col-0, **B**, líneas PHOR1-OE, **C**, mutante *sid1* y **D**, doble mutante *pub27pub28*. Las hojas infectadas se fotografiaron 2 días después de la infección.

A su vez, cuando se estudió la respuesta de estas mismas líneas a infecciones producidas por patógenos necrótrofos, como el hongo *Botrytis cinerea* (Fig. 53), observamos que la sobre-expresión de PHOR1 confiere una mayor susceptibilidad a este hongo al igual que la sobre-expresión de SLY1, si bien el efecto de SLY1 era notablemente menor que la de PHOR1.



**Figura 53.** Susceptibilidad de las líneas PHOR1-OE, SLY1-OE y *pub27pub28* a la infección por el hongo necrótrofo *B. cinerea*. El color oscuro sólido representa el nivel más alto de daño causado por el patógeno, mientras que el color sólido claro representa el nivel más bajo de daño.

En este caso, no observamos un comportamiento opuesto (más resistente) de la línea mutante *pub27/pub28*, como se había observado en las infecciones con el biótrofo *PstDC3000*. La línea *pub27/pub28* mostró también una respuesta hipersensible a este hongo, similar a la observada en las líneas SLY1-OE (Fig.53).



Aunque desconocemos a que se debe esta respuesta, cabe resaltar que durante la caracterización molecular de dicho mutante se observó una regulación retrógrada de los genes PUB. La expresión del gen *PUB29* en efecto se encuentra fuertemente activada en el mutante nulo *pub27/pub28* y es posible que esta activación sea responsable de la respuesta hipersensible observada en estas líneas. Sin embargo, sería necesario un análisis más detallado de estas líneas para confirmar esta hipótesis. A su vez, estamos generando líneas RNAi para el gen *PUB29* en el fondo *pub27/pub28* que ayudaran a comprender mejor este fenotipo.

Estudios recientes han demostrado que los mutantes DELLA son más resistentes a patógenos biótrosos como *Pseudomonas syringae* y más susceptibles a infecciones por hongos necrótrosos como *B. cinerea* (Navarro L. y col., resultados pendientes de publicación). Resultados obtenidos en nuestro laboratorio utilizando los mutantes *global* y *gal-3*, el cuál acumula niveles elevados de los represores DELLA, por otra parte, han confirmado estos datos. Así, las líneas de sobre-expresión de PHOR1 mostrarían un fenotipo de defensa similar a los mutantes DELLA nulos. Ello estaría de acuerdo con la hipótesis que PHOR1 y SLY1 desestabilizan los represores DELLA, potenciando la respuesta de defensa a biótrosos y reprimiendo la respuesta a necrótrosos. Sin embargo, es importante resaltar que mientras que la proteína F-box SLY1 induce una desestabilización de los represores GAI y RGA mayor que PHOR1 (los represores GAI y RGA son los que en condiciones normales se acumulan en tejidos vegetativos y son detectados con el anticuerpo anti-DELLA), es precisamente en las líneas de sobre-expresión de PHOR1 donde observamos una mayor resistencia a biótrosos y una susceptibilidad más elevada a necrótrosos. Ello indicaría una función específica de PHOR1 en la reacción de defensa, mientras que SLY1 actuaría preferentemente durante el crecimiento y elongación celular. En línea con esta hipótesis, hemos observado que la expresión de los homólogos PUB es fuertemente inducida en respuesta a elicitores y que RGL3 juega una papel más prevalente que las otros DELLA en la inhibición del crecimiento de la raíz en respuesta a flagelina. Estos datos indicarían que PHOR1 podría actuar de forma preferente sobre RGL3, ejerciendo así un papel principal en la potenciación de la respuesta de defensa frente a patógenos biótrosos.

***DISCUSIÓN.***



## **DISCUSIÓN.**

### **1.- LA FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA PHOR1 DE PATATA ESTÁ CONSERVADA EN *Arabidopsis*.**

Los datos publicados por Amador y col., 2001<sup>(5)</sup>, demostraban que la proteína PHOR1 de patata migra al núcleo en respuesta a GAs y que las líneas con niveles reducidos de expresión de este gen son parcialmente insensibles a estas hormonas. Ello indicaba que PHOR1 podía ser un regulador positivo de la ruta de señalización. Nuestro primer objetivo fue el estudio de la actividad de ésta proteína en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, ya que en esta especie se dispone de un mayor número de herramientas genéticas y moleculares para el estudio de su posible mecanismo de acción.

En una primera aproximación, se identificó los genes de *Arabidopsis* con una función ortóloga al gen de patata. Así, se comparó la proteína PHOR1 con los genes de la familia U-box/ARM-repeat de *Arabidopsis* y se identificaron 3 genes que compartían una similitud mayor con el gen de patata, y por tanto podían corresponder a sus ortólogos. La identificación de estos genes, junto con la observación que uno de ellos (*AtPUB28*) mostraba un patrón de expresión muy parecido al gen de patata, sugería que la función de la proteína PHOR1 podría conservarse también en *Arabidopsis*.

En segundo lugar, se transformaron de manera estable plantas de *Arabidopsis* con la construcción PHOR1-GFP, bajo control del promotor viral 35S. En estas plantas se observó que PHOR1 presentaba una localización subcelular similar a la reportada previamente en células BY2 de tabaco<sup>(5)</sup>. En efecto, la proteína se distribuía a manera de gránulos en el citoplasma, y en algunas células se observaba también una señal fluorescente nuclear. Para confirmar una migración al núcleo dependiente de GAs, se trataron las plantas con GAs o con PAC. La proteína de fusión respondía a estos tratamientos igual que en las células de tabaco, mostrando una localización citosólica en presencia de PAC y una migración de gran parte de la proteína de fusión al núcleo en respuesta a GAs. Así pues, la redistribución citosólico-nuclear estaba conservada en *Arabidopsis*.

En ensayos posteriores pudimos también comprobar que las plantas PHOR1-GFP se comportan igual que las líneas PHOR1-OE y que las semillas de estas plantas son capaces de germinar en presencia de concentraciones mayores de PAC que las semillas control, lo que demostraba una resistencia parcial a este inhibidor. Ello indicaría que la proteína de fusión PHOR1-GFP es funcionalmente activa y que la migración al núcleo inducida por GAs podría ser relevante para la actividad biológica de la proteína.

### **2.- PHOR1 ESTA ASOCIADA A LA MEMBRANA DE VESÍCULAS IMPLICADAS EN TRÁFICO INTRACELULAR.**

Nuestro siguiente objetivo fue estudiar la identidad de las vesículas en las que se localiza PHOR1-GFP, con el propósito de determinar si estas correspondían a vesículas implicadas en el tráfico endomembranas. Utilizando estudios de centrifugación diferencial demostramos que la proteína se asocia a la fracción

microsomal, bien sea a la membrana plasmática ó a las fracciones endosomales, y que no se detecta en la fracción soluble, lo que confirmaría que no existe libre en el citosol. PHOR1 sin embargo, no presenta ningún péptido N-terminal conocido que pueda determinar su entrada en la vía secretora, aunque sí que posee una región hidrofóbica en su dominio central, que podría mediar una asociación de la proteína a la membrana, de manera periférica. De hecho, cuando las fracciones microsomales que contenían la proteína se sometieron a un ensayo de solubilización diferencial, observamos que la proteína no se libera en un lavado con el propio tampón, pero si en los lavados con los tampones de alta sal, urea ó TX-100, al igual que la proteína vacuolar *AtVPS45p*<sup>(12)</sup>, lo que era indicativo de una asociación periférica a la membrana ó a complejos anclados a la membrana celular<sup>(12)</sup>. Posteriormente, procedimos a caracterizar el tipo de organelos ó vesículas a los que se encuentra asociada la proteína, ya que ello podría darnos indicaciones sobre su función. Al someter la fracción microsomal a centrifugación diferencial en un gradiente lineal de sacarosa observamos que PHOR1 co-fracciona con la proteína periférica de compartimento pre-vacuolar *AtVCL1* y no con la proteína integral de retículo *AtSEC12*<sup>(137)</sup>, lo que era indicativo de una localización en vesículas implicadas en el tráfico intracelular.

Tras tratar las plantas con la droga brefeldina A, la cuál bloquea el transporte retrógrado desde Golgi al ER, así como el transporte en la red trans-Golgi (TGN) y el transporte endocítico, para dar lugar a unas estructuras conocidas como cuerpos de BFA<sup>(12, 118)</sup>, observamos que la proteína PHOR1-GFP cambiaba en efecto su localización formando este tipo de agregados perinucleares. Ello demostraría que los gránulos que se observan en el citosol corresponden a vesículas de tráfico intracelular, implicados en secreción ó en endocitosis. Un tratamiento con citocalasina D (CytD) por otra parte, era capaz de bloquear el movimiento que acompaña a estas vesículas, lo que demostraría que dicho movimiento es dependiente de los filamentos de actina.

Dado que estos resultados sugerían una asociación de la proteína PHOR1 con endosomas, se incubó las plantas de *Arabidopsis* con el fluoróforo de membrana FM4-64 a fin de co-localizar la fluorescencia de este marcador y la de la proteína PHOR1. De este modo, se vio que PHOR1 co-localiza con vesículas endocíticas tardías, pero no con vesículas endocíticas a tiempos tempranos, lo que señalaría una función más bien tardía de PHOR1 en alguna vía de señalización dependiente de la internalización de proteínas de membrana.

### **3.- PHOR1 INTERACCIONA CON RGA A TRAVÉS DEL DOMINIO CONSERVADO DELLA.**

En experimentos *pull-down* utilizando las proteínas de fusión PHOR1-St, GST-PUB27, GST-PUB28 y GST-PUB29 comprobamos que estas proteínas son capaces de interactuar con las proteínas DELLA *in vitro*, y que dicha interacción es específica puesto que no se observa con el control negativo GST-ARC1.

Estos ensayos evidenciaron también una interacción de PHOR1 con sus homólogos de *Arabidopsis*, lo que sugiere que los miembros de esta subfamilia de proteínas forman dímeros. No se observó una interacción similar con la proteína U-box ARC1, lo que indicaría que la dimerización está restringida a miembros de



la misma subfamilia de proteínas. Tampoco se observó una interacción con la proteína F-box SLY1, lo que indicaría que la función E3 ligasa de estas proteínas es independiente de SLY1.

En este contexto, es importante señalar que una dimerización similar a la observada se ha reportado también para la proteína U-box *AtPUB14*, utilizada como prototipo de las proteínas U-box/ARM-repeat de *Arabidopsis*. En un análisis estructural de este dímero, se identificaron varios residuos aromáticos en dos regiones  $\alpha$ -hélice situadas en los extremos N- y C-terminal del dominio U-box, como los residuos requeridos para la dimerización<sup>(7)</sup>. Por tanto, es posible que la auto-asociación a través del dominio U-box sea un rasgo común a todas las proteínas U-box y que dicha dimerización sea necesaria para la actividad E3 ubiquitin ligasa de estas proteínas<sup>(171)</sup>.

A fin de identificar los dominios en los represores DELLA que participan en la interacción con PHOR1, se generaron distintas delecciones que cubrían diferentes regiones de la proteína RGA. Los ensayos *pull-down* con estos diferentes dominios mostraron que tanto PHOR1 como la proteína F-box SLY1 eran capaces de unir fuertemente la construcción NS, que incluye el dominio conservado DELLA. La construcción F1 que incluye el dominio DELLA y las dos cremalleras de leucina se unió también a ambas resinas pero con una afinidad menor. También se detectó una interacción débil de ambas proteínas con la construcción **Relig**, correspondiente a la región C-terminal de la proteína. En los mismos ensayos, ni la proteína U-box PHOR1 ni SLY1 unieron la construcción M5 que comprende la región C-terminal de la proteína y los dos dominios cremallera de leucina, ni tampoco la construcción **del-1** que incluye la región C-terminal de la proteína hasta el segundo dominio cremallera de leucina. Tampoco se detectó una unión de ninguna de estas proteínas con la resina GST-ARC1, utilizada como control negativo de interacción. Estos resultados demostrarían la existencia de 2 dominios importantes para la interacción, el dominio DELLA y el extremo C-terminal de la proteína. La presencia de los dominios cremallera de leucina (en M5 ó **del-1**) parece enmascarar el dominio de interacción en el extremo C-terminal, debido probablemente a que dicho dominio queda escondido dentro de la proteína. La interacción con el dominio DELLA, por otra parte, no requiere del extremo C-terminal, ya que se observa una fuerte interacción con las construcciones NS y F1, que carecen de este dominio.

Estos resultados estarían en concordancia parcial con los resultados obtenidos por Dill y col., 2004 en ensayos doble-híbrido<sup>(33)</sup> y que identificaron un dominio de interacción en el extremo C-terminal de la proteína. Sin embargo, a diferencia de estos estudios, observamos que ambas proteínas unen fuertemente el dominio DELLA (NS) y muestran una afinidad mucho mayor por este dominio que la observada para la proteína RGA completa. Ello estaría de acuerdo con observaciones realizadas *in vivo* utilizando las proteínas de fusión GAI-GFP y RGA-GFP, las cuales demostraban que el dominio DELLA es necesario para que estas proteínas represoras sean degradadas en presencia de GAs<sup>(31, 122)</sup>. Resultados más recientes han demostrado también que el receptor GID1 se une a este dominio y posiblemente lo modifica mediante fosforilación, lo que incrementa la afinidad de unión a la proteína F-box SLY1. Ello favorece la poli-ubiquitinación de estas proteínas represoras, señalando así su degradación por el sistema proteasoma.

Los ensayos de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC) confirmaron esta interacción en plantas de tabaco y demostraron que ambas proteínas co-localizan en el núcleo y son capaces de interaccionar *in vivo*.

#### **4.- PHOR1 ES UNA E3 LIGASA CAPAZ DE UBIQUITINAR LAS PROTEÍNAS REPRESORAS DELLA *IN VITRO*.**

Los experimentos de ubiquitinación llevados a cabo en este trabajo demostraron que PHOR1 tiene actividad E3 ligasa y es capaz de auto-ubiquitinarse *in vitro*. La delección del dominio U-box de la proteína PHOR1 suprime la auto-ubiquitinación. En presencia del inhibidor de proteasoma MG132, por otra parte, se inhibe la progresiva desaparición de la proteína, lo que demostraría que PHOR1 es una E3 ligasa.

Se ha demostrado que la actividad E3 ligasa de las proteínas U-box reside en este único polipéptido, que es capaz de unir la actividad E2 conjugadora de ubiquitina a través del dominio U-box, mientras que los dominios WD40, BTB ó ARM-repeat presentes en gran número de estas proteínas están involucrados en el reconocimiento del sustrato<sup>(61)</sup>. La actividad ligasa de estas proteínas, es por tanto, relativamente fácil de determinar *in vitro*, ya que sólo requiere la incubación de la proteína U-box con su respectiva proteína diana, en presencia de las actividades E1, E2 y el complejo 26S proteasoma. Se ha reportado que tanto el lisado de reticulocito de conejo (RRL) como el de germen de trigo (WGL), utilizados para la traducción *in vitro* de proteínas, son una fuente excelente de enzimas de ubiquitinación y de los componentes del 26S proteasoma, por lo que constituyen una base apropiada para estos ensayos<sup>(14)</sup>. De hecho, mientras que las E3 ligasas han divergido y son específicas de cada organismo<sup>(10)</sup>, las actividades E1, E2 y el sistema proteasoma están muy conservados en levaduras, animales y plantas. Ello hace que las E3 ligasas de plantas sean capaces de utilizar los enzimas E1 y E2 del lisado de reticulocito para la transferencia de ubiquitina, y por tanto puedan ubiquitinar sus propias proteínas diana en presencia de RRL.

Así, la incubación de PHOR1 con la proteína represora RGA marcada radiactivamente y con ubiquitina, ATP y RRL, resultó en una rápida degradación de esta proteína represora a la vez que causó la propia degradación de la proteína PHOR1, como consecuencia de la reacción de auto-ubiquitinación. La adición del inhibidor específico de proteasoma, MG132, inhibe dicha degradación, evidenciando que esta desestabilización está mediada por el proteasoma. La desestabilización de ambas proteínas, por otra parte, depende de la actividad E3 ligasa de PHOR1, ya que la delección del dominio U-box suprime completamente la degradación de las dos proteínas. En ausencia de PHOR1, RGA es totalmente estable, lo que indica que esta proteína represora no es sustrato de ninguna actividad E3 ligasa endógena del RRL. Aún más relevante, es el hecho que la degradación de la proteína RGA requiere la presencia del dominio DELLA intacto en la proteína y que la delección de este dominio inhibe la degradación de este represor. Así, en conjunto, estos resultados demuestran que PHOR1 es capaz de ubiquitinar los represores DELLA y señalar su degradación por el proteasoma 26S y que esta proteína es suficiente para unir y ubiquitinar estos represores, sin que se requiera la participación de otros componentes adicionales para dicha actividad.



En un ensayo sistemático de la actividad E3 ligasa asociada a diferentes miembros de la familia PUB de *Arabidopsis*, se demostró que PUB29 tiene también actividad E3 ligasa y que funcionaría preferentemente con un subgrupo de enzimas E2 conjugadoras de ubiquitina<sup>(111)</sup>. Así, es muy posible que las tres proteínas homólogas de *Arabidopsis* sean también activas y tengan una función redundante.

## **5.- LA SOBRE-EXPRESIÓN DE PHOR1 CONFIERE UNA MAYOR RESISTENCIA A PAC EN LÍNEAS SILVESTRES Y UNA RESPUESTA MAYOR A GAs EN LOS MUTANTES *gal-3*.**

Para demostrar una función de la proteína PHOR1 como regulador positivo de la señal de GAs, transformamos líneas silvestres y el mutante *gal-3* que presenta un bloqueo en un paso temprano de la ruta de biosíntesis de GAs, con la construcción 35S::PHOR1. Se obtuvieron líneas homocigotas con elevados niveles de expresión de PHOR1 y se evaluó su fenotipo. Se observó que las líneas PHOR-OE eran capaces de germinar en presencia de mayores concentraciones de PAC que las líneas control. Del mismo modo, las líneas PHOR1-OE x *gal-3* requirieron una concentración de GAs exógenas menor que las líneas control *gal-3* para germinar. Sin embargo, estas líneas no mostraron ningún otro fenotipo aparente y especialmente la sobre-expresión de PHOR1 no es capaz de revertir el fenotipo enano y reducida fertilidad de las plantas *gal-3* adultas. Estos datos demostrarían que PHOR1 funciona en efecto como un regulador positivo de la ruta de señalización de GAs pero, posiblemente está implicado en la regulación de únicamente una parte de estas respuestas ó por el contrario es sólo activo en ciertas células ó tejidos como la semilla. A su vez, el hecho que estas proteínas puedan auto-ubiquitinarse y sean rápidamente desestabilizadas, podría ser indicativo de una función como moduladores de la estabilidad de los represores DELLA, pero con una vida media muy corta.

## **6.- LA SOBRE-EXPRESIÓN DE PHOR1 REVIERTE PARCIALMENTE EL FENOTIPO ENANO CONFERIDO POR LA MUTACIÓN *sly1-10*.**

Para evaluar mejor la función de PHOR1 en la degradación de las proteínas DELLA, se cruzó las líneas de sobre-expresión de ésta proteína con el mutante nulo *sly1-10*. Este mutante presenta una lesión en el gen *SLEEPY1* que codifica la subunidad F-box del complejo SCF<sup>S<sup>LY</sup>1</sup> y se caracteriza por presentar un fenotipo enano debido a la acumulación niveles elevados de los represores DELLA<sup>(42, 108, 145)</sup>. Por tanto representaba un fondo genético ideal para estudio de la actividad desestabilizadora de las DELLA asociada a PHOR1.

Las semillas homocigotas PHOR1-OE x *sly1-10* germinaron mucho mejor que las semillas *sly1-10*<sup>(155)</sup>, evidenciando así que la sobre-expresión de PHOR1 es capaz de compensar parcialmente el bloqueo en la actividad SCF<sup>S<sup>LY</sup>1</sup>. En la planta adulta, se observaba también una reversión parcial del fenotipo enano del mutante *sly1-10* y dicha reversión, iba acompañada de una disminución en los niveles de acumulación de los represores DELLA, lo que indica que PHOR1 es capaz de degradar a estos represores a través de una cascada de señalización independiente

del complejo SCF<sup>SLY1</sup>. Las líneas PHOR1-OE x *sly1-10* sin embargo, son aún enanas y producen un número reducido de semillas por silicua y acumulan niveles más elevados de los represores DELLA que las líneas silvestres, lo que sugiere que esta vía no es tan activa como la vía de SCF<sup>SLY</sup> ó que se requiere algún tipo de señal adicional para su activación.

## **7.- FUNCIÓN DE PHOR1 Y SUS HOMÓLOGOS DE *Arabidopsis* EN LA RESPUESTA DE INMUNIDAD BASAL INDUCIDA POR FLAGELINA.**

Por consiguiente, a pesar de que los datos obtenidos relacionaban PHOR1 y sus homólogos en *Arabidopsis* con la respuesta a GAs, los fenotipos observados en las líneas PHOR1-OE ó en los mutantes *pub27*, *pub29* ó el doble mutante *pub27 pub29* no parecían estar de acuerdo con un papel principal de estas proteínas en el control de la elongación y crecimiento de la planta. De ello concluimos que era posible que estos genes estuvieran implicados en alguna respuesta ó proceso específico activados en respuesta a condiciones externas determinadas.

Al analizar el patrón de expresión de los homólogos *PUB27/28/29* en la base de datos genevestigator, observamos que los tres genes eran inducidos a tiempos cortos en respuesta a elicitores fúngicos y bacterianos<sup>(193)</sup> (flagelina, quitina) y en respuesta a la infección por *P. syringae*. De los 41 genes de la familia U-box/ARM identificados en *Arabidopsis*, existen otros 5 miembros, i.e. *PUB20/21/22/23/24*, cuya expresión se induce también en respuesta a elicitores (datos obtenidos de la base de datos genevestigator). Por otra parte, de aquellos miembros de la familia cuya función es conocida, en al menos cuatro casos, i.e. *SPL11* (*Spotted Leaf 11*) de arroz y su homólogo *PUB13* de *Arabidopsis*, *ACRE276* (*Avr9/Cf-9 Rapidly Elicited 276*) de tabaco y su homólogo *PUB17* de *Arabidopsis*, y *ACRE74* y sus homólogos *PUB20* y *21* de *Arabidopsis*, se ha descrito un papel regulador de estas proteínas en defensa, como activadores de la respuesta hipersensible y muerte celular programada en respuesta a patógenos biótros<sup>(54, 185, 188)</sup>. Curiosamente, mientras que *PUB 17*, *PUB20* y *PUB21* son reguladores positivos de la HR, *PUB13* funcionaría como regulador negativo de este proceso.

Con estos antecedentes, decidimos analizar si PHOR1 podría estar implicado en defensa y para ello confirmamos en primer lugar los datos de los arrays publicados en la base de datos genevestigator. Mediante análisis northern comprobamos que los mensajeros correspondientes a los genes *PUB27*, *PUB28* y *PUB29* se inducen de manera rápida y transitoria en respuesta a flg22 y quitina, lo cuál podía ser indicativo de una función de estos genes en la reacción basal de defensa.

Evaluamos seguidamente si la sobre-expresión de PHOR1 alteraba la respuesta a flg22 de la planta. Este péptido, además de elicitar la respuesta basal de defensa, induce una inhibición del crecimiento de la raíz que puede analizarse fácilmente midiendo el tamaño de las raíces de plántulas crecidas en el medio suplementado con flg22. Al estudiar este efecto, observamos que mientras el ecotipo *Col-0* es muy poco sensible a la aplicación de flg22, el ecotipo *Ler* responde bien a este elicitor, lo que permitió comparar la respuesta de distintas líneas mutantes en este fondo genético. Al analizar las líneas de sobre-expresión



PHOR1-OE y PHOR1-GFP en este ecotipo, confirmamos que estas líneas son mucho más resistentes a la aplicación de flagelina que las líneas silvestres, lo que demostraría una función de PHOR1 en la ruta de defensa activada por este elicitor.

En el laboratorio hemos comprobado que PHOR1 y los homólogos PUB27, PUB28 y PUB29 interactúan en un ensayo doble híbrido en levadura con el dominio quinasa del receptor FLS2 de flagelina. Este receptor está comprendido por un dominio extracelular LRR, un dominio trans-membrana y un dominio intracelular quinasa, y se localiza de manera constitutiva en la membrana plasmática<sup>(51)</sup>. La unión de flagelina al dominio LRR, estimula la endocitosis del receptor y activa la ruta de señalización, iniciando una cascada de fosforilación mediada por MAP-quinasas, y una rápida (1 h) desestabilización del receptor<sup>(135)</sup>. Se ha demostrado que la endocitosis del receptor no es sólo parte del mecanismo de degradación sino que también es esencial para la señalización<sup>(4)</sup>. A su vez, se ha reportado que una modificación del tipo multi-Ub es importante para promover la endocitosis de receptores de membrana<sup>(27, 57)</sup> y de hecho, la localización de PHOR1 en vesículas de endocitosis tardías, junto con la activación de los PUBs a tiempos cortos después de la aplicación de flagelina, podrían ser indicativas de una función de estos genes en la modulación de la endocitosis y/o degradación de FLS2. Actualmente, estamos realizando estudios en el laboratorio para confirmar esta interacción *in vivo*.

## **8.- LOS REPRESORES DELLA Y LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE flg22.**

Independientemente de estos resultados, nuestros estudios habían demostrado que PHOR1 degrada las proteínas DELLA tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. Por tanto, una hipótesis tentadora era suponer que PHOR1 podía mediar su función en defensa a través de la degradación de las proteínas DELLA. En efecto, se había descrito que los mutantes DELLA nulos son más resistentes a infecciones por patógenos biotrofos como *Pseudomonas* y más sensibles a patógenos necrótrofos como *Botrytis*, lo cual implicaba estos represores en la respuesta basal de defensa.

Aunque hasta la fecha no se ha establecido una relación clara entre las GAs y la ruta de señalización de defensa, es importante resaltar que en respuesta al tratamiento con flg22, se inducen dos de los genes GA 2-oxidasa (*At1g30040* y *At1g02400*) y se reprime la expresión del gen *GA4* (*At1g15550*) correspondiente a una GA3- $\beta$ -hidroxilasa. Ello haría que los niveles de GAs bioactivas se vean reducidos y en consecuencia la estabilidad de los represores DELLA se vea incrementada. Curiosamente, en este mismo experimento se observa que los niveles de expresión de RGA y GAI se reducen en respuesta al elicitor flg22<sup>(193)</sup>, por otro lado se ha visto que tras el tratamiento con JA, la expresión del gen *RGL3* se ve incrementada (Solano R., comunicación oral).

Así pues, para evaluar si las proteínas DELLA participan en la respuesta al elicitor flg22, estudiamos la respuesta de inhibición del crecimiento de la raíz del mutante *global* con una mutación en los 5 genes y del mutante *tetra* que conserva una copia activa del gen *RGL3*. Curiosamente, en estos estudios observamos que ambos mutantes se comportan de un modo diferente. Mientras que el mutante *global* es insensible a flg22 al igual que las líneas PHOR1-OE, el mutante *tetra*

mostró una respuesta normal ó incluso exagerada frente a este elicitor. Ello apuntaría al gen *RGL3* (el único DELLA con una función desconocida hasta la fecha) como posible responsable de la respuesta de defensa, por lo que procedimos a evaluar la respuesta a flg22 del mutante nulo *rgl3-3* y de la línea de sobre-expresión GFP-RGL3. Así, observamos que mientras que el mutante *rgl3-3* muestra una respuesta reducida a flg22, la línea GFP-RGL3 es hiper-sensible a este elicitor. En este contexto es importante resaltar que el mutante *rgl3-3* se halla en el fondo *Col-0*, pero aún así observamos una clara diferencia en la respuesta de este mutante respecto al control *Col-0*. Actualmente hemos obtenido la mutación en el fondo *Ler* a fin de comprobar estos resultados.

En su conjunto, estos datos demostrarían un papel de los represores DELLA en la respuesta basal de defensa, a la vez que indicarían que RGL3 posiblemente es el responsable principal de esta regulación. La función de los represores DELLA en defensa no es del todo sorprendente, sobre todo si consideramos los datos reportados por otros laboratorios en los que se demostró que tanto el etileno (ET) como las auxinas pueden modular la estabilidad de estos represores. En efecto ET estabiliza estas proteínas, en tanto que las auxinas promueven su degradación. Se han observado cambios en los niveles endógenos de ambas hormonas asociados a la reacción de defensa, y por tanto es posible que esos cambios sean en último término los responsables de modular la estabilidad de estos represores. La función de las GAs en defensa, por el contrario, no está aún bien establecida. Sin embargo, los resultados aquí presentados podrían ser indicativos de una función de estas hormonas en la respuesta de defensa, señalizando la migración de PHOR1 al núcleo y así la degradación de los represores DELLA.

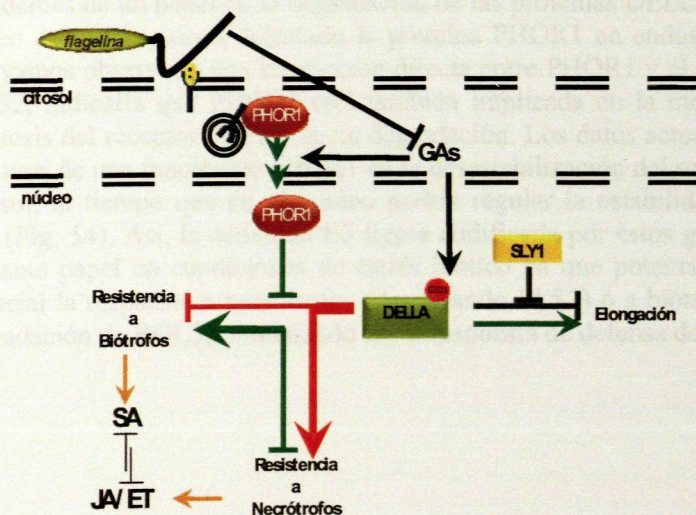
## **9.- PHOR1 PROMUEVE LA RESISTENCIA A PATÓGENOS BIÓTROFOS E INDUCE LA SUSCEPTIBILIDAD A NECRÓTROFOS.**

Considerando los resultados anteriores que demostraban que las líneas PHOR1-OE eran resistentes a flg22, decidimos comprobar si dicha insensibilidad se correlaciona también con una mayor resistencia a patógenos biótrofos. Así, evaluamos la sensibilidad de las plantas PHOR1-OE y del doble mutante *pub27/pub29* a diferentes patógenos como *Pseudomonas syringae* (biótrofo) ó *Botrytis cinerea* (necrótrofo). En estos estudios comprobamos que las plantas PHOR1-OE son en efecto más resistentes a la infección por *P. syringae* pv *tomato* DC3000 y más sensibles a la infección por *B. cinerea*. El doble mutante, por el contrario, mostró ser más sensible a la infección por *Pst* aunque era también ligeramente más sensible a la infección por *Botritis*. Este resultado es algo contradictorio ya que indicaría que el mutante no muestra un comportamiento opuesto al de las líneas de sobre-expresión. Sin embargo, en este mutante el tercer ortólogo *PUB28* es aún activo y podría ser responsable de dicho fenotipo parcial. En análisis northern comprobamos que este gen está, en efecto, sobre-expresado en el doble mutante *pub27/pub29*, lo que podría complementar de manera parcial los efectos de la mutación en los otros dos genes. Actualmente, estamos generando líneas RNAi para el gen *PUB28* en el fondo *pub27/pub29*, dado que no existe ninguna mutación para este gen en las colecciones de mutantes disponibles.



Por su parte, en el laboratorio se han hibridado microarrays de *Arabidopsis* ([www.chem.agilent.com](http://www.chem.agilent.com)) con los RNAs obtenidos a partir de líneas que sobreexpresan *PUB27* vs plantas silvestres *Col-0*. Se han identificado aproximadamente 150 genes que se encuentran inducidos constitutivamente en las líneas 35S::PUB27 (el criterio de selección fue un fold change >1,8 y pvalue <0,05). El 70% de estos genes se inducen en respuesta a elicitores (datos obtenidos del Bio-Array Resource for *Arabidopsis* Functional Genomics, [www.bar.utoronto.ca](http://www.bar.utoronto.ca)). Entre estos genes, se incluyen distintos genes implicados en la activación de la ruta del SA, factores de transcripción de la familia WRKY<sup>(117, 193)</sup> genes de resistencia del tipo TIR-NBS-LRR, factores de respuesta a etileno tipo ERF<sup>(117, 193)</sup>, numerosas defensinas, así como una tirosina aminotransferasa inducida en respuesta a JA y coronatina<sup>(107, 143)</sup>, y marcadores de la respuesta a flg22 tales como FRK1, WRKY29 y la CHP-rich zinc finger protein *At2g17740*<sup>(64)</sup>, lo que corroboraría una función de este ortólogo de PHOR1 en la reacción basal de defensa.

La suma de estos resultados es indicativa de una función de PHOR1 y sus genes ortólogos en la modulación la respuesta de defensa basal (respuesta a elicitores), promoviendo una activación de la ruta de defensa frente a biótrofos, y al mismo tiempo una inhibición de la defensa frente a necrótrofos. Nuestros datos implicarían también a las proteínas DELLA en la regulación de este proceso, lo que nos permite postular el modelo presentado en la Fig. 54.



**Figura 54.** Modelo de la función de PHOR1 en respuesta de defensa. En condiciones normales, las proteínas DELLA se acumulan en el núcleo y reprimen la elongación celular. Las GAs inducen la ubiquitinación de estos represores por el complejo SCF<sup>SLY</sup> y su posterior degradación por el sistema 26S proteasoma, permitiendo el crecimiento de la planta. En condiciones de estrés biótico, los niveles endógenos de GAs se verían reducidos y se produciría una acumulación de los represores DELLA en el núcleo. Estos represores confieren resistencia a patógenos necrótrofos y susceptibilidad a patógenos biótrofos. Cuando la infección es causada por un patógeno biótrofo, la percepción de flg22 por el receptor de membrana FLS2 induce la endocitosis del receptor, el cual es finalmente degradado por PHOR1 en las vesículas endocíticas tardías. flg22 también promueve una migración de PHOR1 al núcleo, donde induce la degradación de DELLA, promoviendo una mayor resistencia al patógeno biótrofo, al potenciar la vía del SA.



Según este modelo, en condiciones normales las GAs inducen la degradación de los represores DELLA en una ruta dependiente de la proteína F-box SLY1. Durante la infección por patógenos biótrofos se reducen los niveles endógenos de GAs y se estabilizan los represores DELLA. Mediante este mecanismo el patógeno frena la ruta de defensa dependiente de SA y favorece así su propagación. El reconocimiento del elicitor flg22 por el receptor de membrana FLS2, pone en marcha la reacción de defensa basal y activa la expresión de PHOR1 ó sus ortólogos, capaces de degradar los represores DELLA y en particular RGL3, en una ruta independiente de SLY1. Ello promueve la ruta de señalización de GAs y favorece la migración al núcleo de PHOR1 potenciándose dicha respuesta. Mientras que en condiciones normales SLY1 es la principal responsable de degradar los represores DELLA, PHOR1 es dispensable, en condiciones de infección por patógenos biótrofos, la principal E3 ligasa responsable de degradar los represores DELLA. Ello activaría las rutas específicas de defensa, probablemente a través de un reajuste hormonal que potencia la vía del SA, en detrimento de la vía del JA/ET, confiriendo así resistencia frente a éstos patógenos. Estudios dirigidos a comprobar este modelo se están llevando a cabo en la actualidad en el laboratorio, analizando por un lado la estabilidad de la fusión GFP-RGL3 tras la aplicación de flg22 y/ó GAs y por otro lado cruzando las líneas 35S::GFP-RGL3 con las líneas PHOR1-OE y SLY1-OE a fin de comprobar si RGL3 es desestabilizada de manera diferencial por estas dos actividades E3 ligasa.

Además de un papel en la degradación de las proteínas DELLA en el núcleo, el hecho de que hayamos detectado la proteína PHOR1 en endosomas tardíos y que hayamos observado una interacción directa entre PHOR1 y el dominio kinasa de FLS2, indicaría que PHOR1 está también implicada en la modulación de la endocitosis del receptor FLS2 ó en su degradación. Los datos actuales podrían ser indicativos de una función de PHOR1 en la desestabilización del receptor FLS2 en el citosol, al tiempo que en el núcleo podría regular la estabilidad del represor RGL3 (Fig. 54). Así, la actividad E3 ligasa codificada por estos genes jugaría un importante papel en condiciones de estrés biótico ya que potenciaría de manera diferencial la respuesta a necrótrofos (degradando FLS2) ó a biótrofos (mediante la degradación de RGL3), modulando así la respuesta de defensa de la planta.



***CONCLUSIONES.***

## CONCLUSIONES.

Esta tesis doctoral ha estado encaminada a la comprensión del mecanismo de acción de la proteína PHOR1. Los resultados obtenidos indican que PHOR1 actúa degradando las proteínas DELLA y que está involucrada en la defensa basal en *Arabidopsis*. Se propone un modelo que implica a PHOR1 y las proteínas DELLA en defensa.

1. PHOR1 se localiza en vesículas de endocitosis, y eventualmente en el núcleo, en plantas transgénicas de *Arabidopsis*. La localización nuclear se incrementa en respuesta a GAs, lo que permite concluir que la función de PHOR1 está conservada en *Arabidopsis*, y proponer una función de la proteína en la señalización de GAs.
2. Ensayos *pull-down* han demostrado que PHOR1 interacciona con las proteínas DELLA *in vitro*, y un ensayo de complementación bimolecular fluorescente demostró que PHOR1 y RGA también interaccionan *in vivo*.
3. En ensayos *pull-down* se mapearon los dominios DELLA y C-terminal de la proteína RGA, como los dominios responsables de la interacción con PHOR1 y estos mismos dominios participarían en la interacción con SLY1.
4. PHOR1 es una E3 ubiquitina-ligasa activa, capaz de auto-ubiquitinarse y de ubiquitinar al represor RGA *in vitro*, señalando su degradación por el sistema 26S-proteasoma.
5. La sobre-expresión de PHOR1 en *Arabidopsis* incrementa la resistencia a PAC de las líneas silvestres y confiere una mayor sensibilidad a GA3 de las líneas mutantes *gal-3* durante la germinación.
6. La sobre-expresión de PHOR1 revierte parcialmente el fenotipo enano y la germinación defectuosa de los mutantes *sly1-10*. Dicho fenotipo se correlaciona con una disminución en los niveles de acumulación de las proteínas DELLA, lo que indica que PHOR1 es capaz de señalar *in vivo* la degradación de las proteínas DELLA, a través de una ruta independiente de SLY1.
7. La expresión de los homólogos de PHOR1 en *Arabidopsis* se induce en respuesta al elicitor flagelina (flg22) y las líneas que sobre-expresan PHOR1 son insensibles al tratamiento con este elicitor, lo que sugiere una función de estos genes en la respuesta basal de defensa.
8. La sensibilidad a flg22 está inversamente relacionada con la acumulación de RGL3. Ello indica que este represor, cuya función se desconocía, está implicado en la reacción de defensa basal de la planta.



**9.** La sobre-expresión de PHOR1 confiere resistencia a patógenos biótropos y susceptibilidad a necrótrofos y el mismo fenotipo de defensa se observa en los mutantes DELLA nulos, con una mutación en los 5 genes DELLA. Ello indicaría que PHOR1 degrada estos represores durante la respuesta de defensa.

**10.** Las líneas SLY1-OE, por el contrario, muestran una sensibilidad a flg22 y una respuesta a la infección por patógenos similar a la de las líneas silvestres. Ello indicaría que PHOR1 y SLY1 degradan las proteínas DELLA en rutas distintas, SLY1 actuando como nodo de integración de señales ambientales en el control del crecimiento, en tanto que PHOR1 tendría una función en la reacción de defensa de la planta frente a patógenos.

## ***BIBLIOGRAFÍA.***



## BIBLIOGRAFÍA.

1. Achard P, Cheng H, De Grauwe L, Decat J, Schoutteten H, et al. 2006. Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* 311: 91-4
2. Achard P, Vriezen WH, Van Der Straeten D, Harberd NP. 2003. Ethylene regulates arabidopsis development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *Plant Cell* 15: 2816-25
3. Alabadi D, Gil J, Blazquez MA, Garcia-Martinez JL. 2004. Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiol* 134: 1050-7
4. Altenbach D, Robatzek S. 2007. Pattern recognition receptors: from the cell surface to intracellular dynamics. *Mol Plant Microbe Interact* 20: 1031-9
5. Amador V, Monte E, Garcia-Martinez JL, Prat S. 2001. Gibberellins signal nuclear import of PHOR1, a photoperiod-responsive protein with homology to *Drosophila* armadillo. *Cell* 106: 343-54
6. Amasino RM. 1986. Acceleration of nucleic acid hybridization rate by polyethylene glycol. *Anal Biochem* 152: 304-7
7. Andersen P, Kragelund BB, Olsen AN, Larsen FH, Chua NH, et al. 2004. Structure and biochemical function of a prototypical Arabidopsis U-box domain. *J Biol Chem* 279: 40053-61
8. Appleford NE, Evans DJ, Lenton JR, Gaskin P, Croker SJ, et al. 2006. Function and transcript analysis of gibberellin-biosynthetic enzymes in wheat. *Planta* 223: 568-82
9. Asahina M, Iwai H, Kikuchi A, Yamaguchi S, Kamiya Y, et al. 2002. Gibberellin produced in the cotyledon is required for cell division during tissue reunion in the cortex of cut cucumber and tomato hypocotyls. *Plant Physiol* 129: 201-10
10. Azevedo C, Santos-Rosa MJ, Shirasu K. 2001. The U-box protein family in plants. *Trends Plant Sci* 6: 354-8
11. Bachmair A, Novatchkova M, Potuschak T, Eisenhaber F. 2001. Ubiquitylation in plants: a post-genomic look at a post-translational modification. *Trends Plant Sci* 6: 463-70
12. Bassham DC, Raikhel NV. 1998. An Arabidopsis VPS45p homolog implicated in protein transport to the vacuole. *Plant Physiol* 117: 407-15
13. Bensen RJ, Beall FD, Mullet JE, Morgan PW. 1990. Detection of Endogenous Gibberellins and Their Relationship to Hypocotyl Elongation in Soybean Seedlings. *Plant Physiol* 94: 77-84
14. Bloom J, Amador V, Bartolini F, DeMartino G, Pagano M. 2003. Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitinylation. *Cell* 115: 71-82
15. Boss'PK, Thomas MR. 2002. Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation. *Nature* 416: 847-50
16. Bulley SM, Wilson FM, Hedden P, Phillips AL, Croker SJ, James DJ. 2005. Modification of gibberellin biosynthesis in the grafted apple scion allows control of tree height independent of the rootstock. *Plant Biotechnol J* 3: 215-23
17. Callis J, Carpenter T, Sun CW, Vierstra RD. 1995. Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in Arabidopsis thaliana ecotype Columbia. *Genetics* 139: 921-39
18. Callis J, Vierstra RD. 2000. Protein degradation in signaling. *Curr Opin Plant Biol* 3: 381-6

19. Cao D, Hussain A, Cheng H, Peng J. 2005. Loss of function of four DELLA genes leads to light- and gibberellin-independent seed germination in *Arabidopsis*. *Planta* 223: 105-13
20. Carrera E, Jackson SD, Prat S. 1999. Feedback control and diurnal regulation of gibberellin 20-oxidase transcript levels in potato. *Plant Physiol* 119: 765-74
21. Ciechanover A. 1998. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *Embo J* 17: 7151-60
22. Clough SJ, Bent AF. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735-43
23. Coles JP, Phillips AL, Croker SJ, Garcia-Lepe R, Lewis MJ, Hedden P. 1999. Modification of gibberellin production and plant development in *Arabidopsis* by sense and antisense expression of gibberellin 20-oxidase genes. *Plant J* 17: 547-56
24. Curaba J, Moritz T, Blervaque R, Parcy F, Raz V, et al. 2004. AtGA3ox2, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is regulated during embryogenesis by LEAFY COTYLEDON2 and FUSCA3 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 136: 3660-9
25. Cheng H, Qin L, Lee S, Fu X, Richards DE, et al. 2004. Gibberellin regulates *Arabidopsis* floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* 131: 1055-64
26. Chiang HH, Hwang I, Goodman HM. 1995. Isolation of the *Arabidopsis* GA4 locus. *Plant Cell* 7: 195-201
27. d'Azzo A, Bongiovanni A, Nastasi T. 2005. E3 ubiquitin ligases as regulators of membrane protein trafficking and degradation. *Traffic* 6: 429-41
28. Dangl JL, Jones JD. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-33
29. Davidson SE, Elliott RC, Helliwell CA, Poole AT, Reid JB. 2003. The pea gene NA encodes ent-kaurenoic acid oxidase. *Plant Physiol* 131: 335-44
30. DeMartino GN, Slaughter CA. 1999. The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J Biol Chem* 274: 22123-6
31. Dill A, Jung HS, Sun TP. 2001. The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14162-7
32. Dill A, Sun T. 2001. Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 159: 777-85
33. Dill A, Thomas SG, Hu J, Steber CM, Sun TP. 2004. The *Arabidopsis* F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell* 16: 1392-405
34. Dreher K, Callis J. 2007. Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. *Ann Bot (Lond)* 99: 787-822
35. Eriksson S, Bohlenius H, Moritz T, Nilsson O. 2006. GA4 is the active gibberellin in the regulation of LEAFY transcription and *Arabidopsis* floral initiation. *Plant Cell* 18: 2172-81
36. Etlinger JD, Goldberg AL. 1977. A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 54-8
37. Fagoaga C, Tadeo FR, Iglesias DJ, Huerta L, Lliso I, et al. 2007. Engineering of gibberellin levels in citrus by sense and antisense overexpression of a GA 20-oxidase gene modifies plant architecture. *J Exp Bot* 58: 1407-20
38. Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T. 1999. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J* 18: 265-76



39. Fleet CM, Yamaguchi S, Hanada A, Kawaide H, David CJ, et al. 2003. Overexpression of AtCPS and AtKS in Arabidopsis confers increased entkaurene production but no increase in bioactive gibberellins. *Plant Physiol* 132: 830-9
40. Frangioni JV, Neel BG. 1993. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal Biochem* 210: 179-87
41. Fu X, Harberd NP. 2003. Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. *Nature* 421: 740-3
42. Fu X, Richards DE, Ait-Ali T, Hynes LW, Ougham H, et al. 2002. Gibberellin-mediated proteasome-dependent degradation of the barley DELLA protein SLN1 repressor. *Plant Cell* 14: 3191-200
43. Fu X, Richards DE, Fleck B, Xie D, Burton N, Harberd NP. 2004. The Arabidopsis mutant sleepy1gar2-1 protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCFSLY1 E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *Plant Cell* 16: 1406-18
44. Fujioka S, Yamane H, Spray CR, Gaskin P, Macmillan J, et al. 1988. Qualitative and Quantitative Analyses of Gibberellins in Vegetative Shoots of Normal, dwarf-1, dwarf-2, dwarf-3, and dwarf-5 Seedlings of Zea mays L. *Plant Physiol* 88: 1367-72
45. Garcia-Martinez JL, Lopez-Diaz I, Sanchez-Beltran MJ, Phillips AL, Ward DA, et al. 1997. Isolation and transcript analysis of gibberellin 20-oxidase genes in pea and bean in relation to fruit development. *Plant Mol Biol* 33: 1073-84
46. Geldner N, Anders N, Wolters H, Keicher J, Kornberger W, et al. 2003. The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* 112: 219-30
47. Geldner N, Jurgens G. 2006. Endocytosis in signalling and development. *Curr Opin Plant Biol* 9: 589-94
48. Gilroy S, Jones RL. 1994. Perception of Gibberellin and Absciscic Acid at the External Face of the Plasma Membrane of Barley (Hordeum vulgare L.) Aleurone Protoplasts. *Plant Physiol* 104: 1185-92
49. Glickman MH, Adir N. 2004. The proteasome and the delicate balance between destruction and rescue. *PLoS Biol* 2: E13
50. Gomez-Gomez L, Bauer Z, Boller T. 2001. Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 13: 1155-63
51. Gomez-Gomez L, Boller T. 2000. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol Cell* 5: 1003-11
52. Gomez-Gomez L, Boller T. 2002. Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci* 7: 251-6
53. Gomi K, Sasaki A, Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, et al. 2004. GID2, an F-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice. *Plant J* 37: 626-34
54. Gonzalez-Lamothe R, Tsitsigiannis DI, Ludwig AA, Panicot M, Shirasu K, Jones JD. 2006. The U-box protein CMPG1 is required for efficient activation of defense mechanisms triggered by multiple resistance genes in tobacco and tomato. *Plant Cell* 18: 1067-83

55. Grebe M, Xu J, Mobius W, Ueda T, Nakano A, et al. 2003. Arabidopsis sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes. *Curr Biol* 13: 1378-87
56. Gubler F, Chandler PM, White RG, Llewellyn DJ, Jacobsen JV. 2002. Gibberellin signaling in barley aleurone cells. Control of SLN1 and GAMYB expression. *Plant Physiol* 129: 191-200
57. Haglund K, Dikic I. 2005. Ubiquitylation and cell signaling. *Embo J* 24: 3353-9
58. Halim VA, Vess A, Scheel D, Rosahl S. 2006. The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defence. *Plant Biol (Stuttg)* 8: 307-13
59. Harberd NP, King KE, Carol P, Cowling RJ, Peng J, Richards DE. 1998. Gibberellin: inhibitor of an inhibitor of? *Bioessays* 20: 1001-8
60. Hartmann-Petersen R, Gordon C. 2004. Protein degradation: recognition of ubiquitinated substrates. *Curr Biol* 14: R754-6
61. Hatakeyama S, Nakayama KI. 2003. U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases. *Biochem Biophys Res Commun* 302: 635-45
62. Hatakeyama S, Yada M, Matsumoto M, Ishida N, Nakayama KI. 2001. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J Biol Chem* 276: 33111-20
63. Haywood V, Yu TS, Huang NC, Lucas WJ. 2005. Phloem long-distance trafficking of GIBBERELLIC ACID-INSENSITIVE RNA regulates leaf development. *Plant J* 42: 49-68
64. He P, Shan L, Lin NC, Martin GB, Kemmerling B, et al. 2006. Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in Arabidopsis innate immunity. *Cell* 125: 563-75
65. Hedden P. 2003. The genes of the Green Revolution. *Trends Genet* 19: 5-9
66. Hedden P, Kamiya Y. 1997. GIBBERELLIN BIOSYNTHESIS: Enzymes, Genes and Their Regulation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 431-60
67. Hedden P, Phillips AL. 2000. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci* 5: 523-30
68. Hedden P, Phillips AL. 2000. Manipulation of hormone biosynthetic genes in transgenic plants. *Curr Opin Biotechnol* 11: 130-7
69. Hedden P, Phillips AL, Rojas MC, Carrera E, Tudzynski B. 2001. Gibberellin Biosynthesis in Plants and Fungi: A Case of Convergent Evolution? *J Plant Growth Regul* 20: 319-31
70. Heese A, Hann DR, Gimenez-Ibanez S, Jones AM, He K, et al. 2007. The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12217-22
71. Helliwell CA, Chandler PM, Poole A, Dennis ES, Peacock WJ. 2001. The CYP88A cytochrome P450, ent-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2065-70
72. Helliwell CA, Sullivan JA, Mould RM, Gray JC, Peacock WJ, Dennis ES. 2001. A plastid envelope location of Arabidopsis ent-kaurene oxidase links the plastid and endoplasmic reticulum steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *Plant J* 28: 201-8
73. Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A. 1983. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem* 258: 8206-14
74. Hicke L, Dunn R. 2003. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 141-72
75. Hochstrasser M. 1996. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* 30: 405-39



76. Holler D, Dikic I. 2004. Receptor endocytosis via ubiquitin-dependent and -independent pathways. *Biochem Pharmacol* 67: 1013-7
77. Hooley R, Beale MH, Smith SJ. 1990. Gibberellin perception in the *Avena fatua* aleurone. *Symp Soc Exp Biol* 44: 79-86
78. Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK. 2002. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* 9: 789-98
79. Huber AH, Nelson WJ, Weis WI. 1997. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* 90: 871-82
80. Hynes LW, Peng J, Richards DE, Harberd NP. 2003. Transgenic expression of the Arabidopsis DELLA proteins GAI and gai confers altered gibberellin response in tobacco. *Transgenic Res* 12: 707-14
81. Ikeda A, Ueguchi-Tanaka M, Sonoda Y, Kitano H, Koshioka M, et al. 2001. slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8. *Plant Cell* 13: 999-1010
82. Ingle RA, Carstens M, Denby KJ. 2006. PAMP recognition and the plant-pathogen arms race. *Bioessays* 28: 880-9
83. Ingram TJ, Reid JB. 1987. Internode Length in *Pisum*: Gene na May Block Gibberellin Synthesis between ent-7alpha-Hydroxykaurenoic Acid and Gibberellin A(12)-Aldehyde. *Plant Physiol* 83: 1048-53
84. Israelsson M, Mellerowicz E, Chono M, Gullberg J, Moritz T. 2004. Cloning and overproduction of gibberellin 3-oxidase in hybrid aspen trees. Effects on gibberellin homeostasis and development. *Plant Physiol* 135: 221-30
85. Israelsson M, Sundberg B, Moritz T. 2005. Tissue-specific localization of gibberellins and expression of gibberellin-biosynthetic and signaling genes in wood-forming tissues in aspen. *Plant J* 44: 494-504
86. Itoh H, Matsuoka M, Steber CM. 2003. A role for the ubiquitin-26S-proteasome pathway in gibberellin signaling. *Trends Plant Sci* 8: 492-7
87. Itoh H, Shimada A, Ueguchi-Tanaka M, Kamiya N, Hasegawa Y, et al. 2005. Overexpression of a GRAS protein lacking the DELLA domain confers altered gibberellin responses in rice. *Plant J* 44: 669-79
88. Itoh H, Tatsumi T, Sakamoto T, Otomo K, Toyomasu T, et al. 2004. A rice semi-dwarf gene, Tan-Ginbozu (D35), encodes the gibberellin biosynthesis enzyme, ent-kaurene oxidase. *Plant Mol Biol* 54: 533-47
89. Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Sato Y, Ashikari M, Matsuoka M. 2002. The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei. *Plant Cell* 14: 57-70
90. Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Sentoku N, Kitano H, Matsuoka M, Kobayashi M. 2001. Cloning and functional analysis of two gibberellin 3 beta -hydroxylase genes that are differently expressed during the growth of rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8909-14
91. Jiang J, Ballinger CA, Wu Y, Dai Q, Cyr DM, et al. 2001. CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation. *J Biol Chem* 276: 42938-44
92. Jones JD, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature* 444: 323-9
93. Kaiser P, Wohlschlegel J, Raymond JD. 2005. Identification of Ubiquitination Sites and Determination of Ubiquitin[hyphen (true graphic)]Chain Architectures by Mass Spectrometry. In *Methods in Enzymology*, pp. 266: Academic Press
94. Kamiya Y, Garcia-Martinez JL. 1999. Regulation of gibberellin biosynthesis by light. *Curr Opin Plant Biol* 2: 398-403

95. Kaneko M, Itoh H, Inukai Y, Sakamoto T, Ueguchi-Tanaka M, et al. 2003. Where do gibberellin biosynthesis and gibberellin signaling occur in rice plants? *Plant J* 35: 104-15
96. Kim M, Cho HS, Kim DM, Lee JH, Pai HS. 2003. CHRK1, a chitinase-related receptor-like kinase, interacts with NtPUB4, an armadillo repeat protein, in tobacco. *Biochim Biophys Acta* 1651: 50-9
97. Kim YS, Lee JH, Yoon GM, Cho HS, Park SW, et al. 2000. CHRK1, a chitinase-related receptor-like kinase in tobacco. *Plant Physiol* 123: 905-15
98. King KE, Moritz T, Harberd NP. 2001. Gibberellins are not required for normal stem growth in *Arabidopsis thaliana* in the absence of GAI and RGA. *Genetics* 159: 767-76
99. Kobayashi M, MacMillan J, Phinney B, Gaskin P, Spray CR, Hedden P. 2000. Gibberellin biosynthesis: metabolic evidence for three steps in the early 13-hydroxylation pathway of rice. *Phytochemistry* 55: 317-21
100. Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H. 2002. Seed dormancy and germination. *Curr Opin Plant Biol* 5: 33-6
101. Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G. 2004. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* 16: 3496-507
102. Lange T, Kappler J, Fischer A, Frisse A, Padeffke T, et al. 2005. Gibberellin biosynthesis in developing pumpkin seedlings. *Plant Physiol* 139: 213-23
103. Lee S, Cheng H, King KE, Wang W, He Y, et al. 2002. Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes Dev* 16: 646-58
104. Libault M, Wan J, Czechowski T, Udvardi M, Stacey G. 2007. Identification of 118 *Arabidopsis* transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plant-defense elicitor. *Mol Plant Microbe Interact* 20: 900-11
105. Loake G, Grant M. 2007. Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol* 10: 466-72
106. Lockard RG, Grunwald C. 1970. Grafting and Gibberellin Effects on the Growth of Tall and Dwarf Peas. *Plant Physiol* 45: 160-2
107. Lopukhina A, Dettenberg M, Weiler EW, Hollander-Czytko H. 2001. Cloning and characterization of a coronatine-regulated tyrosine aminotransferase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 126: 1678-87
108. McGinnis KM, Thomas SG, Soule JD, Strader LC, Zale JM, et al. 2003. The *Arabidopsis* SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell* 15: 1120-30
109. Monna L, Kitazawa N, Yoshino R, Suzuki J, Masuda H, et al. 2002. Positional cloning of rice semidwarfing gene, sd-1: rice "green revolution gene" encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis. *DNA Res* 9: 11-7
110. Moon J, Parry G, Estelle M. 2004. The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *Plant Cell* 16: 3181-95
111. Mudgil Y, Shiu SH, Stone SL, Salt JN, Goring DR. 2004. A large complement of the predicted *Arabidopsis* ARM repeat proteins are members of the U-box E3 ubiquitin ligase family. *Plant Physiol* 134: 59-66
112. Nagpal P, Ellis CM, Weber H, Ploense SE, Barkawi LS, et al. 2005. Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* 132: 4107-18
113. Nakajima M, Shimada A, Takashi Y, Kim YC, Park SH, et al. 2006. Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *Plant J* 46: 880-9



114. Nakajima M, Takita K, Wada H, Mihara K, Hasegawa M, et al. 1997. Partial purification and characterization of a gibberellin-binding protein from seedlings of *Azukia angularis*. *Biochem Biophys Res Commun* 241: 782-6
115. Nam KH, Li J. 2002. BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* 110: 203-12
116. Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, et al. 2006. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312: 436-9
117. Navarro L, Zipfel C, Rowland O, Keller I, Robatzek S, et al. 2004. The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol* 135: 1113-28
118. Nebenfuhr A, Ritzenthaler C, Robinson DG. 2002. Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiol* 130: 1102-8
119. Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S. 2003. Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination. *Plant Cell* 15: 1591-604
120. Olszewski N, Sun TP, Gubler F. 2002. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* 14 Suppl: S61-80
121. Park SH, Nakajima M, Hasegawa M, Yamaguchi I. 2005. Similarities and differences between the characteristics of gibberellin-binding protein and gibberellin 2-oxidases in adzuki bean (*Vigna angularis*) seedlings. *Biosci Biotechnol Biochem* 69: 1508-14
122. Peng J, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, et al. 1997. The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* 11: 3194-205
123. Peng J, Harberd NP. 2002. The role of GA-mediated signalling in the control of seed germination. *Curr Opin Plant Biol* 5: 376-81
124. Peng J, Richards DE, Hartley NM, Murphy GP, Devos KM, et al. 1999. 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400: 256-61
125. Phillips AL, Ward DA, Uknes S, Appleford NE, Lange T, et al. 1995. Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from Arabidopsis. *Plant Physiol* 108: 1049-57
126. Pickart CM. 2000. Ubiquitin in chains. *Trends in Biochemical Sciences* 25: 544
127. Pickart CM. 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70: 503-33
128. Pickart CM. 2001. Ubiquitin enters the new millennium. *Mol Cell* 8: 499-504
129. Pickart CM, VanDemark AP. 2000. Opening doors into the proteasome. *Nat Struct Mol Biol* 7: 999
130. Proebsting WM, Hedden P, Lewis MJ, Croker SJ, Proebsting LN. 1992. Gibberellin Concentration and Transport in Genetic Lines of Pea: Effects of Grafting. *Plant Physiol* 100: 1354-60
131. Pysh LD, Wysocka-Diller JW, Camilleri C, Bouchez D, Benfey PN. 1999. The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J* 18: 111-9
132. Radi A, Lange T, Niki T, Koshioka M, Lange MJ. 2006. Ectopic expression of pumpkin gibberellin oxidases alters gibberellin biosynthesis and development of transgenic Arabidopsis plants. *Plant Physiol* 140: 528-36
133. Ritzenthaler C, Nebenfuhr A, Movafeghi A, Stussi-Graud C, Behnia L, et al. 2002. Reevaluation of the effects of brefeldin A on plant cells using tobacco

Bright Yellow 2 cells expressing Golgi-targeted green fluorescent protein and COPI antisera. *Plant Cell* 14: 237-61

134. Robatzek S. 2007. Vesicle trafficking in plant immune responses. *Cell Microbiol* 9: 1-8
135. Robatzek S, Chinchilla D, Boller T. 2006. Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis. *Genes Dev* 20: 537-42
136. Robert-Seilanianantz A, Navarro L, Bari R, Jones JDG. 2007. Pathological hormone imbalances. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 372
137. Rojo E, Zouhar J, Kovaleva V, Hong S, Raikhel NV. 2003. The AtC-VPS protein complex is localized to the tonoplast and the prevacuolar compartment in arabidopsis. *Mol Biol Cell* 14: 361-9
138. Ross JJ, Murfet IC, Reid JB. 1997. Gibberellin mutants. *Physiologia Plantarum* 100: 550-60
139. Rowland O, Ludwig AA, Merrick CJ, Baillieul F, Tracy FE, et al. 2005. Functional analysis of Avr9/Cf-9 rapidly elicited genes identifies a protein kinase, ACIK1, that is essential for full Cf-9-dependent disease resistance in tomato. *Plant Cell* 17: 295-310
140. Sakamoto T, Miura K, Itoh H, Tatsumi T, Ueguchi-Tanaka M, et al. 2004. An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol* 134: 1642-53
141. Sakamoto T, Morinaka Y, Ishiyama K, Kobayashi M, Itoh H, et al. 2003. Genetic manipulation of gibberellin metabolism in transgenic rice. *Nat Biotechnol* 21: 909-13
142. Samuel MA, Salt JN, Shiu SH, Goring DR. 2006. Multifunctional arm repeat domains in plants. *Int Rev Cytol* 253: 1-26
143. Sandorf I, Hollander-Czytko H. 2002. Jasmonate is involved in the induction of tyrosine aminotransferase and tocopherol biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Planta* 216: 173-9
144. Sasaki A, Ashikari M, Ueguchi-Tanaka M, Itoh H, Nishimura A, et al. 2002. Green revolution: a mutant gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature* 416: 701-2
145. Sasaki A, Itoh H, Gomi K, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, et al. 2003. Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science* 299: 1896-8
146. Schmidt TG, Skerra A. 2007. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc* 2: 1528-35
147. Schomburg FM, Bizzell CM, Lee DJ, Zeevaart JA, Amasino RM. 2003. Overexpression of a novel class of gibberellin 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants. *Plant Cell* 15: 151-63
148. Silverstone AL, Ciampaglio CN, Sun T. 1998. The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* 10: 155-69
149. Silverstone AL, Jung HS, Dill A, Kawaide H, Kamiya Y, Sun TP. 2001. Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis. *Plant Cell* 13: 1555-66
150. Silverstone AL, Mak PY, Martinez EC, Sun TP. 1997. The new RGA locus encodes a negative regulator of gibberellin response in Arabidopsis thaliana. *Genetics* 146: 1087-99
151. Silverstone AL, Sun T. 2000. Gibberellins and the Green Revolution. *Trends Plant Sci* 5: 1-2
152. Singh DP, Jermakow AM, Swain SM. 2002. Gibberellins are required for seed development and pollen tube growth in Arabidopsis. *Plant Cell* 14: 3133-47



153. Smalle J, Vierstra RD. 2004. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol* 55: 555-90
154. Smith DB, Johnson KS. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67: 31
155. Steber CM, McCourt P. 2001. A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 125: 763-9
156. Stone SL, Anderson EM, Mullen RT, Goring DR. 2003. ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible Brassica pollen. *Plant Cell* 15: 885-98
157. Sun T. 2000. Gibberellin signal transduction. *Curr Opin Plant Biol* 3: 374-80
158. Sun T, Goodman HM, Ausubel FM. 1992. Cloning the *Arabidopsis* GA1 Locus by Genomic Subtraction. *Plant Cell* 4: 119-28
159. Sun TP, Gubler F. 2004. Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 55: 197-223
160. Sun TP, Kamiya Y. 1994. The *Arabidopsis* GA1 locus encodes the cyclase entkaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* 6: 1509-18
161. Talon M, Koornneef M, Zeevaart JA. 1990. Endogenous gibberellins in *Arabidopsis thaliana* and possible steps blocked in the biosynthetic pathways of the semidwarf *ga4* and *ga5* mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 7983-7
162. Talon M, Zeevaart JA, Gage DA. 1991. Identification of Gibberellins in Spinach and Effects of Light and Darkness on their Levels. *Plant Physiol* 97: 1521-6
163. Thomas SG, Phillips AL, Hedden P. 1999. Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2- oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4698-703
164. Thomas SG, Rieu I, Steber CM. 2005. Gibberellin metabolism and signaling. *Vitam Horm* 72: 289-338
165. Thomas SG, Sun TP. 2004. Update on gibberellin signaling. A tale of the tall and the short. *Plant Physiol* 135: 668-76
166. Toyomasu T, Kawaide H, Mitsuhashi W, Inoue Y, Kamiya Y. 1998. Phytochrome regulates gibberellin biosynthesis during germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Physiol* 118: 1517-23
167. Tudzynski B. 2005. Gibberellin biosynthesis in fungi: genes, enzymes, evolution, and impact on biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 66: 597-611
168. Tyler L, Thomas SG, Hu J, Dill A, Alonso JM, et al. 2004. DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 135: 1008-19
169. Ueda T, Nakano A. 2002. Vesicular traffic: an integral part of plant life. *Curr Opin Plant Biol* 5: 513-7
170. Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, et al. 2005. GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 437: 693-8
171. Vander Kooi CW, Ohi MD, Rosenberg JA, Oldham ML, Newcomer ME, et al. 2006. The Prp19 U-box crystal structure suggests a common dimeric architecture for a class of oligomeric E3 ubiquitin ligases. *Biochemistry* 45: 121-30
172. Vierstra RD. 2003. The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci* 8: 135-42
173. Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D. 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* 33: 949-56

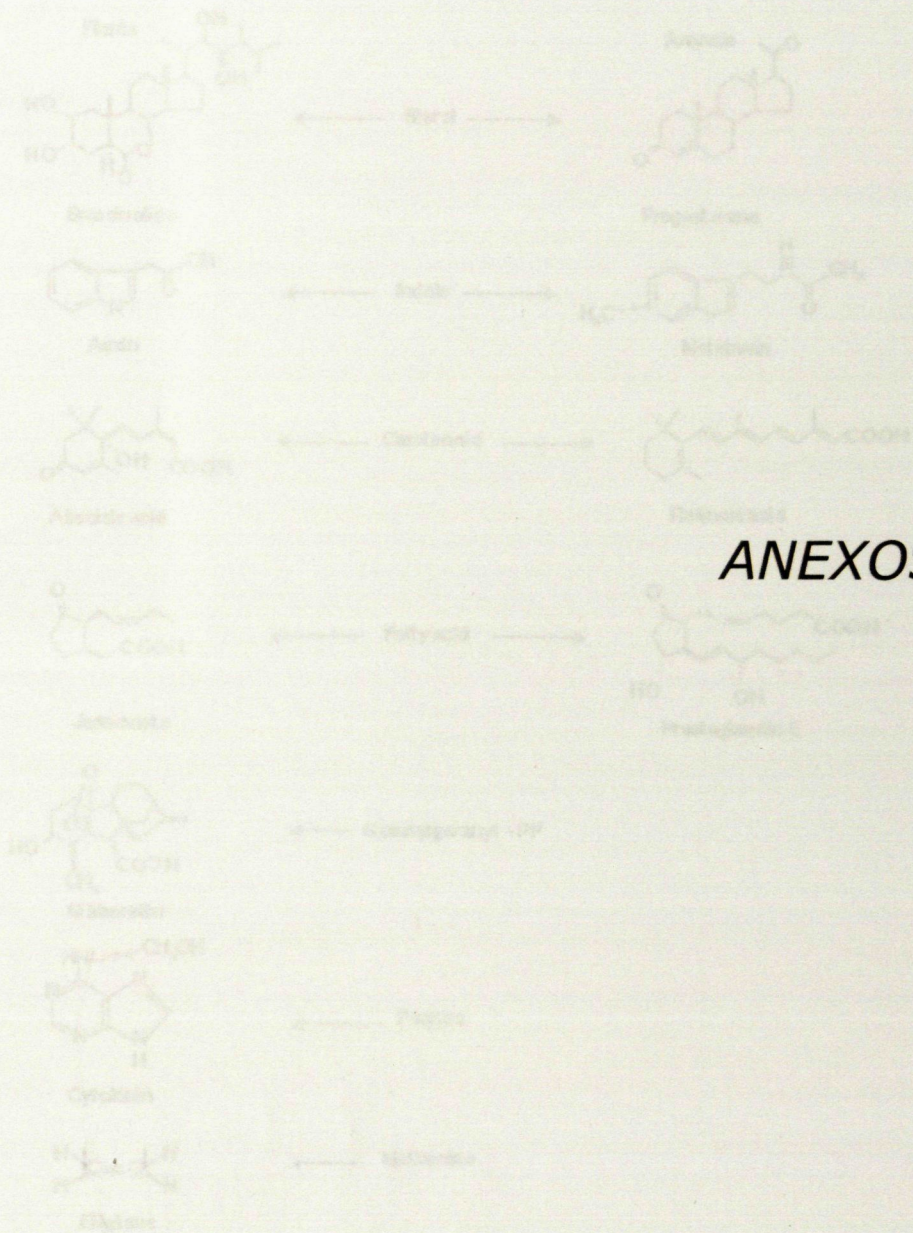
174. Walter M, Chaban C, Schutze K, Batistic O, Weckermann K, et al. 2004. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* 40: 428-38
175. Wang ZY, Seto H, Fujioka S, Yoshida S, Chory J. 2001. BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* 410: 380-3
176. Wen CK, Chang C. 2002. Arabidopsis RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell* 14: 87-100
177. Wilkinson KD, Urban MK, Haas AL. 1980. Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* 255: 7529-32
178. Wilson RN, Somerville CR. 1995. Phenotypic Suppression of the Gibberellin-Insensitive Mutant (gai) of Arabidopsis. *Plant Physiol* 108: 495-502
179. Xu YL, Gage DA, Zeevaart JA. 1997. Gibberellins and stem growth in Arabidopsis thaliana. Effects of photoperiod on expression of the GA4 and GA5 loci. *Plant Physiol* 114: 1471-6
180. Xu YL, Li L, Wu K, Peeters AJ, Gage DA, Zeevaart JA. 1995. The GA5 locus of Arabidopsis thaliana encodes a multifunctional gibberellin 20-oxidase: molecular cloning and functional expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 6640-4
181. Yamaguchi S, Kamiya Y. 2001. Gibberellins and Light-Stimulated Seed Germination. *J Plant Growth Regul* 20: 369-76
182. Yamaguchi S, Smith MW, Brown RG, Kamiya Y, Sun T. 1998. Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3beta-hydroxylase genes in germinating Arabidopsis seeds. *Plant Cell* 10: 2115-26
183. Yamaguchi S, Sun T, Kawaide H, Kamiya Y. 1998. The GA2 locus of Arabidopsis thaliana encodes ent-kaurene synthase of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol* 116: 1271-8
184. Yamauchi Y, Ogawa M, Kuwahara A, Hanada A, Kamiya Y, Yamaguchi S. 2004. Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of Arabidopsis thaliana seeds. *Plant Cell* 16: 367-78
185. Yang CW, Gonzalez-Lamothe R, Ewan RA, Rowland O, Yoshioka H, et al. 2006. The E3 ubiquitin ligase activity of arabidopsis PLANT U-BOX17 and its functional tobacco homolog ACRE276 are required for cell death and defense. *Plant Cell* 18: 1084-98
186. Yang P, Fu H, Walker J, Papa CM, Smalle J, et al. 2004. Purification of the Arabidopsis 26 S proteasome: biochemical and molecular analyses revealed the presence of multiple isoforms. *J Biol Chem* 279: 6401-13
187. Zeevaart JA, Gage DA. 1993. ent-kaurene biosynthesis is enhanced by long photoperiods in the long-day plants Spinacia oleracea L. and Agrostemma githago L. *Plant Physiol* 101: 25-9
188. Zeng LR, Vega-Sanchez ME, Zhu T, Wang GL. 2006. Ubiquitination-mediated protein degradation and modification: an emerging theme in plant-microbe interactions. *Cell Res* 16: 413-26
189. Zimmerli L, Metraux JP, Mauch-Mani B. 2001. beta-Aminobutyric acid-induced protection of Arabidopsis against the necrotrophic fungus Botrytis cinerea. *Plant Physiol* 126: 517-23
190. Zimmerli L, Stein M, Lipka V, Schulze-Lefert P, Somerville S. 2004. Host and non-host pathogens elicit different jasmonate/ethylene responses in Arabidopsis. *Plant J* 40: 633-46
191. Zipfel C, Felix G. 2005. Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr Opin Plant Biol* 8: 353-60



192. Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JD, et al. 2006. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* 125: 749-60
193. Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ, Jones JD, et al. 2004. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* 428: 764-7

## ANEXOS.

### ANEXO 1 Hormonas vegetales y sus respectivos homólogos en animales.

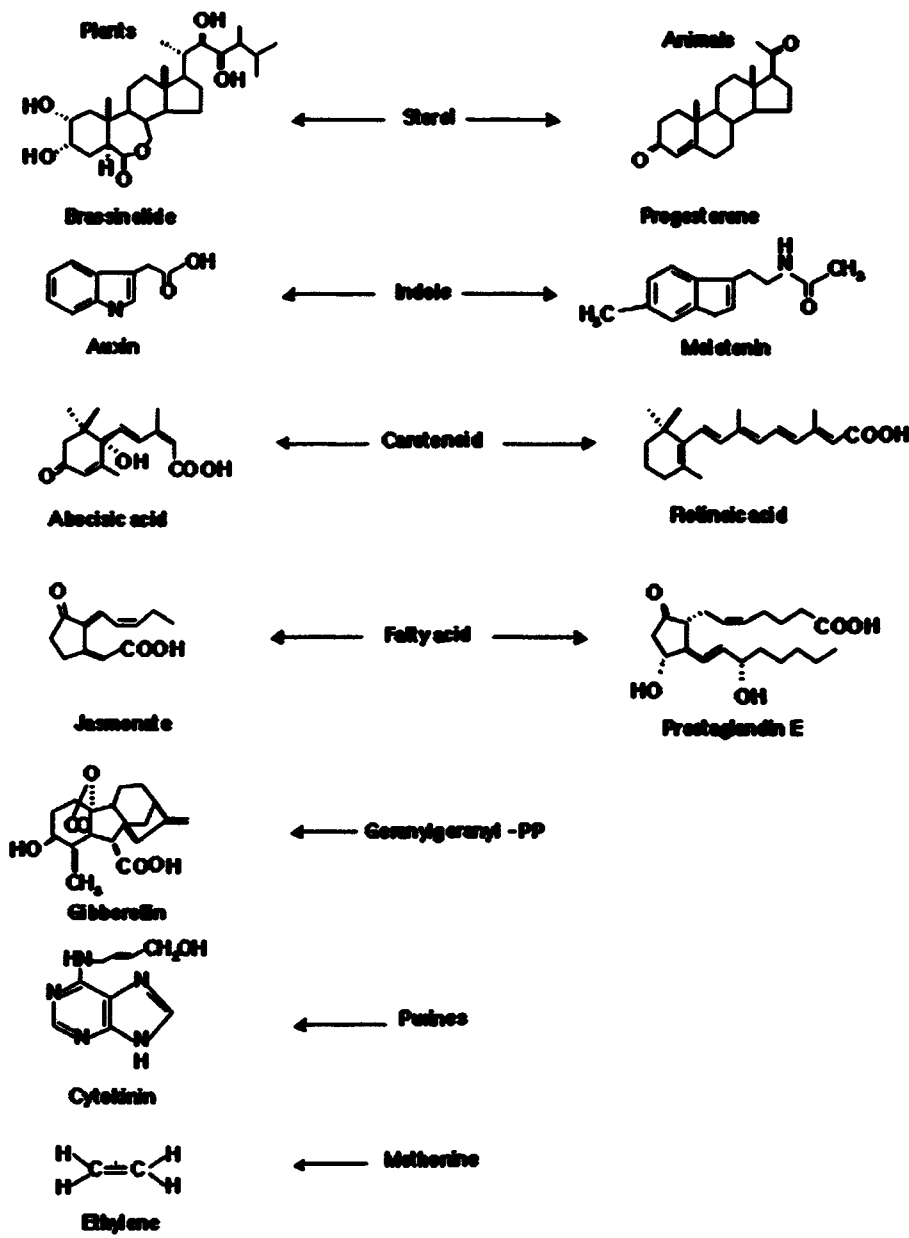


ANEXOS.



**ANEXOS.**

**ANEXO 1. Hormonas vegetales y sus respectivos homólogos en animales.**

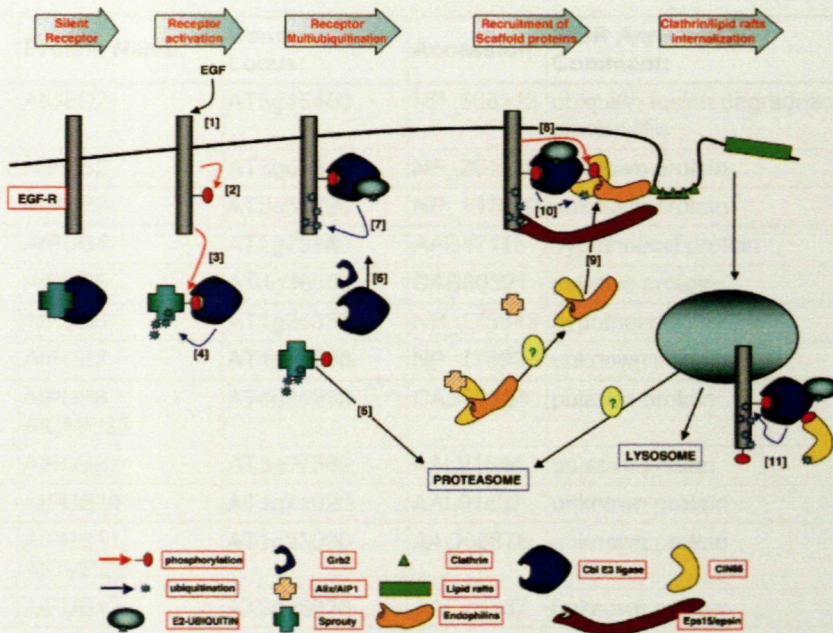


## **ANEXO 2. Lista de genes implicados en la regulación de la señal de GAs.**

Gen	Aislados de	Fenotipos	Codifica
<b>Reguladores positivos</b>			
<i>D1</i>	Arroz	enano insensible a GAs	subunidad $\alpha$ de la proteína G heterotrimérica
<i>GAMYB</i>	cebada, arroz	activador de la $\alpha$ -amilasa	factor de transcripción Myb
<i>GID1</i>	Arroz	enano insensible a GAs. Recesivo.	receptor de GAs
<i>GID2</i>	Arroz	enano insensible a GAs, fertilidad reducida, acumula la proteína SRL1	proteína F-box, homóloga a SLY1
<i>GID1a, 1b, 1c</i>	<i>Arabidopsis</i>	enano insensible a GAs, fertilidad reducida, acumula la proteína DELLA	receptor de GAs
<i>GSE1</i>	Cebada	enano insensible a GAs, acumula la proteína SLN1	desconocido
<i>PHOR1</i>	Patata	las líneas antisentido muestran un fenotipo enano insensible a GAs	proteína U-box/ ARM repeat, E3 ligasa
<i>PKL</i>	<i>Arabidopsis</i>	semi-enano recesivos de hojas verde oscuras, sobreproducción de GAs	factor de remodelaje de cromatina
<i>SLY1</i>	<i>Arabidopsis</i>	enanos insensibles a GAs, incrementa la dormancia de la semilla, fertilidad reducida, acumula proteínas DELLA	proteína F-box, homóloga a GID2
<i>SNE</i>	<i>Arabidopsis</i>	su sobre-expresión suprime el fenotipo enano <i>sly</i>	proteína F-box, homólogo a SLY1
<b>Reguladores negativos</b>			
<i>GAI</i>	<i>Arabidopsis</i>	enano semi-dominante ó recesivo alto, redundante con RGA	subfamilia DELLA
<i>RGA</i>	<i>Arabidopsis</i>	recesivo incrementa longitud del internudo	DELLA
<i>RGL1, RGL2, RGL3</i>	<i>Arabidopsis</i>	RGL1 involucrado en germinación y estatura, RGL2 específico de germinación	DELLA
<i>RSG</i>	Tabaco	dominante negativo enano, reducida GA1	factor de transcripción bZIP
<i>SHI</i>	<i>Arabidopsis</i>	su sobre-expresión incrementa la estatura del mutante enano <i>sly</i>	RING finger
<i>SLN1</i>	Cebada	recesivo incrementa longitud del internudo	DELLA
<i>SLR1</i>	Arroz	recesivo incrementa longitud del internudo	DELLA
<i>SPY</i>	<i>Arabidopsis</i> , cebada	recesivo incrementa longitud del internudo, partenocarpia, resistente a paclobutrazol	O-Glc-NAc transferasa



### ANEXO 3. Modelo de la regulación por endocitosis del receptor EGR mediada por la E3 ligasa Cbl.



Tras la unión del ligando (1), la activación del receptor causa su autofosforilación (2). El receptor activado fosforila al inhibidor de Cbl, Sprouty (2) lo que promueve su poli-Ub por la E3 ligasa Cbl (4) y su degradación por el sistema proteasoma (5). Cbl libre se une conjuntamente con la proteína de unión al receptor Gbr2 al receptor activado EGF-R (6) y media la multi-Ub de éste al tiempo que es fosforilada por el receptor (8). Proteínas accesorias son entonces reclutadas al pre-complejo (9) y ubiquitinadas (10). Una de las proteínas accesorias, EPS15/epsina promueve la internalización del receptor generando vesículas recubiertas de clatrina o rafts lipídicos. El receptor poli-Ub sigue la vía endocítica tras su internalización (11) y es degradado por el lisosoma o por el sistema proteasoma. Adaptado de d'Azzo, A. *et al. Traffic* (2005).



**ANEXO 4. Listado de proteínas con dominios U-box/Arm repeat en *Arabidopsis thaliana*. En rojo se resaltan los homólogos de PHOR1.**

Sub-Class:	Protein Name:	Genomic Locus:	Accession:	TIGR Annotation Comment:
Class I	AtUFD2	AT5g15400	NP_568313	ubiquitin-fusion degradation protein-like
Class II	AtPUB2	AT5g67340	NP_201535	unknown protein
Class II	AtPUB3	AT3g54790	NP_191039	unknown protein
Class II	AtPUB4	AT2g23140	AAB87116	hypothetical protein
Class II	AtPUB5	AT4g36550	CAB80321	putative protein
Class II	AtPUB6	AT1g24330	NP_173843	hypothetical protein
Class II	AtPUB7	AT1g67530	NP_176920	unknown protein
Class II	AtPUB8, AtCMPG3	AT4g21350	CAB79134	putative protein
Class II	AtPUB9	AT3g07360	AAL91644	putative protein
Class II	AtPUB10	AT1g71020	AAL91637	unknown protein
Class II	AtPUB11, AtCMPG6	AT1g23030	AAO00878	unknown protein
Class II	AtPUB12	AT2g28830	AAC79587	unknown protein
Class II	AtPUB13	AT3g46510	AAM91213	arm repeat containing protein homolog
Class II	AtPUB14	AT3g54850	AAM20180	putative protein
Class II	AtPUB15	AT5g42340	NP_199049	arm repeat containing protein
Class II	AtPUB16	AT5g01830	NP_195803	putative protein
Class II	AtPUB17	AT1g29340	AAL36401	arm repeat containing protein
Class II	AtPUB18	AT1g10560	AAL77690	unknown protein
Class II	AtPUB19	AT1g60190	NP_176225	unclassified protein
Class III	AtPUB20, AtCMPG1	AT1g66160	AAL34278	unknown protein
Class III	AtPUB21, AtCMPG5	AT5g37490	NP_198565	putative protein
Class III	AtPUB22	AT3g52450	NP_190813	putative protein
Class III	AtPUB23	AT2g35930	AAD21464	unknown protein
Class III	AtPUB24	AT3g11840	NP_566402	unknown protein
Class III	AtPUB25	AT3g19380	NP_566632	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like
Class III	AtPUB26	AT1g49780	NP_175400	unknown protein
Class III	AtPUB27, AtCMPG2	AT5g64660	NP_201271	unknown protein
Class III	AtPUB28	AT5g09800	NP_196542	putative protein
Class III	AtPUB29	AT3g18710	AAO63423	unknown protein
Class III	AtPUB30	AT3g49810	NP_566927	unknown protein
Class III	AtPUB31, AtCMPG4	AT5g65920	AAM13258	unknown protein
Class IV	AtPUB32	AT3g49060	AAK91387	unknown protein



Class IV	AtPUB33	AT2g45910	AAC28534	putative protein kinase
Class IV	AtPUB34	AT2g19410	AAM14871	putative protein kinase
Class IV	AtPUB35	AT4g25160	CAB79425	putative protein kinase
Class V	AtPUB36	AT3g61390	AAO63431	unknown protein
Class V	AtPUB37	AT2g45920	AAC28533	putative protein
Class II	AtPUB38	AT5g65200	NP_201323	putative protein
Class II	AtPUB39	AT3g47820	AAM14040	putative protein
Class II	AtPUB40	AT5g40140	NP_198830	putative protein
Class II	AtPUB41	AT5g62560	AAM91572	putative protein
Class II	AtPUB42	AT1g68940	NP_177060	hypothetical protein
Class II	AtPUB43	AT1g76390	NP_177765	hypothetical protein
Class II	AtPUB44	AT1g20780	AAM20387	unknown protein
Class II	AtPUB45	AT1g27910	AAM19837	hypothetical protein
Class II	AtPUB46	AT5g18320	NP_197333	putative protein
Class II	AtPUB47	AT5g18330	NP_197334	putative protein
Class II	AtPUB48	AT5g18340	NP_197335	putative protein
Class II	AtPUB49	AT5g67530	AAN46760	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like
Class IV	AtPUB50	AT5g65500	NP_201353	putative protein
Class IV	AtPUB51	AT5g61560	NP_200964	putative protein
Class IV	AtPUB52	AT5g61550	NP_200963	putative protein
Class IV	AtPUB53	AT5g51270	NP_199940	putative protein
Class V	AtPUB54	AT1g01680	NP_171674	hypothetical protein
Class V	AtPUB55	AT1g01660	NP_171672	hypothetical protein
Class V	AtPUB56	AT1g01670	NP_171673	unknown protein
Class V	AtPUB57	AT1g56030	NP_175999	hypothetical protein
Class V	AtPUB58	AT1g56040	NP_176000	hypothetical protein
Class VI	AtPUB59	AT1g04510	AAN13133	putative pre-mRNA splicing factor PRP19
Class VI	AtPUB60	AT2g33340	AAB80652	putative PRP19-like spliceosomal protein
Class VII	AtCHIP	AT3g07370	NP_566305	CHIP-like protein

Lista obtenida de la base de datos del TAIR:

(<http://www.arabidopsis.org/browse/genefamily/pub.jsp#>).





UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID



5408711833